



UNIVERSIDADE DE ÉVORA

ESCOLA DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIAS

DEPARTAMENTO DE ZOOTÉCNIA

**Aplicação de Ureia-PAGE e eletroforese Bidimensional
como técnicas de monitorização da proteólise do
“Queijo de Évora” fabricado com diferentes ecótipos
de *Cynara cardunculus* L.**

Sofia Ramalho Freitas

Orientação | Professora Doutora Cristina Maria dos Santos Conceição
Pinheiro

Professora Doutora Elsa Cristina Carona de Sousa Lamy

Mestrado em Engenharia Zootécnica

Dissertação

Évora, 2017



UNIVERSIDADE DE ÉVORA

ESCOLA DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIAS

DEPARTAMENTO DE ZOOTÉCNIA

Aplicação de Ureia-PAGE e eletroforese Bidimensional como técnicas de monitorização da proteólise do “Queijo de Évora” fabricado com diferentes ecótipos de *Cynara cardunculus* L.

Sofia Ramalho Freitas

Orientação | Professora Doutora Cristina Maria dos Santos Conceição Pinheiro

Professora Doutora Elsa Cristina Carona de Sousa Lamy

Mestrado em Engenharia Zootécnica

Dissertação

Évora, 2017

Aplicação de Ureia-PAGE e eletroforese Bidimensional como técnicas de monitorização da proteólise do “Queijo de Évora” fabricado com diferentes ecótipos de *Cynara cardunculus* L.

Aos meus Pais,

Agradecimentos

À minha orientadora Professora Cristina Pinheiro por todo o apoio, disponibilidade, esforço e partilha de conhecimento, ao longo do mestrado e mais concretamente nesta dissertação.

À Professora Elsa pela transmissão de conhecimentos na área da bioquímica, e a paciência e dedicação que sempre demonstrou na ajuda no laboratório.

À Lénia que foi uma enorme ajuda no laboratório, que sempre nos apoiou em tudo o que foi necessário, e esteve sempre pronta a ajudar e a ensinar todas as técnicas e métodos laboratoriais. Por toda a paciência e compreensão.

À minha colega e grande amiga Ana Lúcia pelo companheirismo no laboratório, bem como a preciosa ajuda em todas as fases deste trabalho. Agradeço por todo o apoio em todos os momentos, bons e menos bons. Sem ela não teria sido possível este trabalho.

Aos meus amigos, por todas as partilhas, ânimo e incentivo em todos os momentos, ao longo deste percurso académico.

À minha família, mas principalmente meus pais que permitiram que cumprisse os meus objetivos, bem como o apoio incondicional, em toda a minha vida. Agradeço por tudo o que têm feito por mim, pela paciência, carinho e amor. Ao meu irmão Ricardo por toda a ajuda e disponibilidade, sem ele seria muito difícil apresentar este trabalho.

Ao João por todo o amor, carinho, paciência e amizade, por estar sempre do meu lado e apoiar-me em todas as minhas escolhas. Por ouvir os meus desabaços e por sempre me animar.

Este trabalho foi financiado por Fundos FEDER através do Programa Alentejo 2020 no âmbito do projeto ValBioTecCynara – Valorização Económica do Cardo (*Cynara cardunculus*): variabilidade natural e suas aplicações biotecnológicas (ALT20-03-0145-FEDER-000038)

Resumo

Apesar do interesse do uso de *Cynara cardunculus* L. na produção de queijo de ovelha, pelos consequentes efeitos nas características sensoriais, há poucos estudos acerca do seu efeito na proteólise do Queijo de Évora.

Nesta dissertação procurou-se otimizar técnicas de extração e separação das caseínas e comparar o efeito de diferentes ecótipos de *Cynara cardunculus* L. na proteólise no Queijo de Évora. Estudou-se os perfis de ambas as frações proteicas, por técnicas de eletroforese unidimensional (ureia-PAGE) para a fração de caseínas, e bidimensional para a fração proteica solúvel em água.

Conclui-se que ambas as técnicas complementam-se no estudo da proteólise do Queijo de Évora. O uso de *Cynara cardunculus* L., como agente coagulante no fabrico deste queijo, promove uma proteólise mais extensa, ou seja, uma maior degradação proteica ao longo da maturação, comparativamente a um agente coagulante animal. Os diferentes ecótipos de cardo resultam em pequenas diferenças na proteólise destes queijos.

Palavras-chave: ValBioTecCynara, Queijo de Évora, *Cynara cardunculus* L., Proteólise, Eletroforese.

[Application of Urea-PAGE and Two-dimensional electrophoresis as techniques for monitoring the proteolysis of “Queijo de Évora” made with different ecotypes of *Cynara cardunculus* L.]

Abstract

Despite the interest in the use of *Cynara cardunculus* L. in the production of ewe's cheese, due to the consequent effects on the sensorial characteristics, there are few studies about its effect on the proteolysis of “Queijo de Évora”.

In this dissertation we optimized techniques for extraction and separation of caseins and compare the effect of different ecotypes of *Cynara cardunculus* L. on proteolysis in the “Queijo de Évora”. The profiles of both protein fractions were studied by one-dimensional electrophoresis techniques (urea-PAGE) for the fraction of caseins, and two-dimensional for the water-soluble protein fraction.

It was concluded that both techniques are complementary in the study of the proteolysis of “Queijo de Évora”. The use of *Cynara cardunculus* L., as a coagulant agent in the manufacture of this cheese, promotes a more extensive proteolysis, that is, a greater protein degradation throughout the ripening, compared to an animal coagulant agent. The different thistle ecotypes result in small differences in the proteolysis of these cheeses.

Keywords: ValBioTecCynara, “Queijo de Évora”, *Cynara cardunculus* L., Proteolysis, Electrophoresis.

Lista de Abreviaturas, Nomenclaturas e Convenções

APS – Persulfato de Amónio

BSA – Albumina de Soro de Bovino

CE – Eletroforese Capilar

CGE – Eletroforese Capilar em gel

cm – Centímetro

CN – Caseína

DOP – Denominação de Origem Protegida

DTT – Ditioneitol

EDTA – Ácido etilenodiaminotetracético

g – Força Centrifuga

g – Grama

h – Hora

HCl – Ácido Clorídrico

HI – Péptidos hidrofílicos

HO – Péptidos Hidrofóbicos

HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Performance

kDa - Kilo Dalton

L – Litro

M - Molar

mM – Milimolar

mm – Milímetro

mA – Milliampere

mL – Mililitro

mg - Miligrama

m/v – Massa por volume

mw – Marcador de massas moleculares

NaOH – Hidróxido de Sódio

RP-HPLC - Cromatografia Líquida de Alta Performance em fase reversa

rpm – Rotações por minuto

Sig – Significância estatística

SDS – Dodecil Sulfato de sódio

SDS-PAGE – Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS

SN/TN – Proporção de azoto solúvel total

SN – Azoto Solúvel

TCA – Ácido Tricloroacético

TEMED – Tetrametiletilenodiamina

TN – Azoto Total

Tris – Tris (hidroximetil)aminometano

Ureia-PAGE - Eletroforese em gel de poliacrilamida com ureia

V – Volts

v/v – Volume por volume

°C – Grau centigrado

µg – micrograma

µL – microlitro

% - Por cento

2D – Eletroforese Bidimensional

Índice

Agradecimentos	v
Resumo.....	viii
Abstract	ix
Lista de Abreviaturas, Nomenclaturas e Convenções	x
Índice de Tabelas.....	xiv
Índice de Figuras	xv
1. Introdução.....	1
2. Revisão Bibliográfica.....	4
2.1. O Queijo de Ovelha e seu Processo de Fabrico	4
2.2. Coagulação e Agentes coagulantes.....	7
2.2.1. Agentes coagulantes de origem animal.....	10
2.2.2. Agentes coagulantes de origem microbiana	11
2.2.3. Agentes coagulantes de origem vegetal.....	11
2.3. A Maturação	14
2.3.1. Proteólise	14
2.3.2. Influência do agente coagulante na proteólise dos queijos.	19
2.4. Métodos de estudo/análise da proteólise no queijo	22
2.4.1. Técnicas eletroforéticas.....	24
2.4.1.1. Ureia-PAGE	26
2.4.1.2. SDS-PAGE	28
2.4.1.3. Eletroforese Bidimensional	29
2.4.1.4. Eletroforese capilar	31
3. Metodologia	33
3.1. 1º Ensaio - Otimização da metodologia para análise do perfil proteico.	33
3.1.1. Recolha e preparação de amostras.....	33
3.1.2. Método de extração e separação das caseínas do queijo.....	33
3.1.3. Eletroforese em gel de poliacrilamida com ureia.....	35
3.1.4. Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS	36
3.2. 2º Ensaio - Análise do perfil proteico do Queijo de Évora	37
3.2.1. Local e Fabrico do Queijo	37
3.2.2. Recolha e preparação de amostras.....	39

3.2.3.	Análise eletroforética das caseínas do queijo de Évora.	40
3.2.4.	Separação das proteínas da fração proteica solúvel do queijo de Évora por eletroforese bidimensional	41
3.3.	Análise Estatística	46
4.	Resultados	47
4.1.	Otimização da técnica de extração das caseínas	47
4.2.	Análise do perfil eletroforético das caseínas no Queijo de Évora	51
4.2.1	Comparação do perfil de caseínas tendo em conta os agentes coagulante e os dias de cura.....	54
4.3.	Estudo e análise da fração proteica solúvel do Queijo de Ovelha por eletroforese Bidimensional.....	61
4.3.1.	Comparação das concentrações ($\mu\text{g/ml}$) das amostras da fração proteica solúvel dos queijos com os vários agentes coagulantes em estudo, ao longo das fases de cura.....	64
4.3.2.	Perfil proteico bidimensional fração proteica solúvel dos queijos fabricados com agente coagulante vegetal ao longo dos dias de cura	65
4.3.3.	Perfil proteico bidimensional da fração proteica solúvel dos queijos fabricados com agente coagulante vegetal e animal ao longo dos dias de cura ...	67
4.3.4.	Comparação dos perfis proteicos entre os vários agentes coagulantes, para cada dia de cura	66
4.3.5.	Comparação das proteínas da fração proteica solúvel ao longo dos vários dias de cura.	67
5.	Discussão	70
6.	Conclusão	75
7.	Bibliografia	77

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Identificação dos três ecótipos de <i>Cynara cardunculus</i> L. escolhidos, com a respectiva descrição, localização e código de laboratório.....	38
Tabela 2 - Condições de temperatura (°C) e humidade relativa (%), das câmaras de refrigeração onde foram colocados os queijos ao longo do tempo de maturação.	39
Tabela 3 - Tabela representativa da recolha das amostras na queijaria e no laboratório	40
Tabela 4 - Concentrações das amostras (µg/ml) da fração solúvel, em água, de cada agente coagulante e em cada dia de cura, analisadas.....	64
Tabela 5 - Tabela das significâncias do tratamento estatístico de comparação entre o coagulante de origem animal e vegetal. (**) - valor $p < 0,05$; (***) - valor $p < 0,01$ (n. s.) - não significativo	67
Tabela 6 - Análise descritiva dos níveis de expressão dos spots que apresentam diferenças significativas para cada agente coagulante, em estudo, tendo em conta os vários dias de cura.....	67
Tabela 7 - Análise descritiva dos níveis de expressão dos spots que apresentam diferenças significativas em cada dia de cura, entre os agentes coagulantes em estudo.....	69

Índice de Figuras

Figura 1 - Processo de Fabrico do Queijo de Ovelha. (Dias, 1997; F. Silva et al., 2001; Veloso, 2001).	5
Figura 2 - Queijo de Évora DOP.	6
Figura 3 - Área geográfica de produção do Queijo de Évora DOP. (Carta administrativa Oficial de Portugal da DGT, versão 2013).	6
Figura 4 - Estrutura Micelar (Cristian M. de Magalhães, 2017; “Milk Composition Physicochemical Properties,” n.d.).	7
Figura 5 – Processo de Coagulação (https://es.slideshare.net/FUSADESORG/4-coagulantes-en-la-industria-lactea)	8
Figura 6 - <i>Cynara cardunculus</i> L. (http://irapl.altervista.org/cpm/albums/bot-units155/cynara-cardunculus-subsp-cardunculus30212.jpg)	12
Figura 7 - <i>Cynara humilis</i> L. (http://floresdoareal.blogspot.pt/2011/08/cynara-humilis-l.html)	12
Figura 8 - Pistilos da planta <i>Cynara cardunculus</i> L., recolhidos para uso como agente coagulante no processo de fabrico do queijo de ovelha.	13
Figura 9 - Agentes potenciadores da proteólise durante a maturação do queijo. Adaptado de Sousa et al. (2001).	16
Figura 10 – Esquema geral da proteólise resultante da ação microbiana durante a maturação dos queijos: 1-descarboxilação; 2-transaminações; 3-desaminações oxidativas; 4-degradações; 5-reduções; 6-oxidações (Perry, 2004).	16
Figura 11 - - Precipitação da fração das caseínas, por centrifugação e adição de acetato de amónio.	34
Figura 12 - Extração e separação da fração do soro.	42
Figura 13 - Esquema representativo do protocolo de eletroforese bidimensional usado para a separação da fração proteica presente na fração proteica solúvel.	45
Figura 14 - Perfil de caseínas em gel de poliacrilamida com ureia, testando diferentes quantidades de amostra precipitada. Mw – marcador de massas das caseínas; 0,25, 0,50, 0,75 e 1,00 g são as quantidades de amostra aplicadas em cada poço; (1) – Amostras com 24 horas; (11) Amostras com 6 dias; (21) Amostras com 8 dias.	48
Figura 15-Perfil de caseínas em gel de poliacrilamida com SDS, testando diferentes volumes de amostra.	49
Figura 16 - Perfil de caseínas em gel de poliacrilamida com ureia, com os diferentes volumes testados de amostra, nos poços.	49
Figura 17- Perfis de caseínas dos queijos, dos três dias de cura, identificando as bandas e as respetivas cubas. C1 e C5- <i>Cynara</i> 1, C2 e C6 – <i>Cynara</i> 2, C3 e C7 – <i>Cynara</i> 3 e C4 e C8 – Coagulante animal.....	51
Figura 18 - Percentagem de volume das diferentes bandas, observadas nos perfis proteicos (ureia-PAGE), nos queijos fabricados com agente coagulante animal e vegetal, considerando todas as fases de cura em conjunto. Valores de média +/- desvio padrão. * significativo para $P < 0,05$	53
Figura 19 - Percentagem de volume das bandas, observadas nos perfis proteicos (ureia-PAGE), nos queijos fabricados com os vários ecótipos de cardo em estudo, considerando todas as fases de cura em conjunto. Valores de média +/- desvio padrão. * significativo para $P < 0,05$..	53
Figura 20 - Gráficos relativos aos níveis de expressão de cada banda, para cada agente coagulante e cada dia de cura. (Letras maiúsculas exprimem as diferenças significativas para um agente coagulante, ao longo dos dias de cura; Letras minúsculas, exprimem entre os	

agentes coagulantes, para cada dias de cura). Valores de média +/- desvio padrão. *	
Significativo para $p<0,05$	56
Figura 21- Gráficos que exprimem os níveis de expressão das caseínas ao longo da maturação, para os diferentes agentes coagulantes: (1) Cynara 1; (2) Cynara2; (3) Cynara 3; (4) Agente Coagulante Animal.	60
Figura 22 - Perfis Bidimensionais da fração proteica solúvel do queijo, para os vários dias de cura e agentes coagulantes.....	62
Figura 23 - Perfil Bidimensional da fração proteica solúvel em água, da amostra de queijo com agente coagulante Cynara 3, com 63 dias de cura.....	63
Figura 24 - Perfil Bidimensional da fração proteica solúvel em água, da amostra de queijo com agente coagulante Animal, com 63 dias de cura.	63
Figura 25 - Variações das concentrações das amostras da fração solúvel, em água, dos vários agentes coagulantes e dias de cura, analisadas. ((1) – 24 horas; (2) – 35 dias; (3) – 63 dias). ...	64
Figura 26 - Análise descritiva e representação gráfica dos spots que apresentam diferenças significativas ($p<0,05$) ao longo dos dias de cura, no Queijo de Évora.	66
Figura 27 - Representação gráfica da variação dos níveis de expressão dos spots, que apresentam diferenças significativas entre agentes coagulantes animal e vegetal, para os vários dias de cura.....	68
Figura 28 - Representação gráfica dos spots que apresentam diferenças significativas ($p<0,05$), entre os dias de cura e os agentes coagulantes (Anexo IV).	69

1. Introdução

O fabrico do queijo em Portugal provém da época das invasões romanas. Com o passar do tempo, e de acordo com hábitos e culturas diversas das populações, os queijos produzidos terão adquirido uma tipicidade e especificidade de acordo com o tipo e zona de produção (Camacho, 1989 citado por Rosa *et al*, 2005).

Em Portugal, encontra-se uma vasta diversidade de queijos de ovelha, com Denominação de Origem Protegida como o Queijo de Évora (DOP), o Queijo de Azeitão, o Queijo de Serpa, o Queijo Serra da Estrela e o Queijo de Nisa (Rosa, Lidon, & Oliveira, 2005) (Macedo, Faro, & Pires, 1993).

No fabrico de queijos, a fase inicial é a coagulação do leite. Deste modo, vários são os tipos de enzimas coagulantes usadas no fabrico do queijo (Shah, Mir, & Paray, 2014). De um modo geral, o queijo é obtido por esgotamento da coalhada após a coagulação de leite cru estreme de ovelha, por ação de uma infusão de cardo (*Cynara cardunculus* L.), conferindo um sabor ligeiramente picante e acidulado.

Segundo o Despacho 29/94 de 4 de Fevereiro (1994) relativo ao Queijo de Évora DOP este é um queijo curado de pasta dura ou semidura, com poucos ou nenhuns olhos e uma coloração ligeiramente amarelada. O uso de leite cru de ovelha na produção do Queijo de Évora DOP, obriga a que o tempo mínimo de maturação seja de 30 dias para um queijo de pasta semidura e para o queijo de pasta dura, o tempo de maturação deve atingir os 90 dias.

As enzimas coagulantes são enzimas proteolíticas, que podem ser de origem animal, microbiana e vegetal (M. Jacob, Jaros, & Rohm, 2011). Nos primórdios da produção de queijo, o agente coagulante mais utilizado foi o de origem animal, particularmente extraído do estômago de ruminantes e especialmente de vitelos. Este agente coagulante é a quimosina, uma enzima proteolítica produzida no quarto estômago destes animais, denominado de abomaso.

Embora o uso de substitutos de coagulantes, produzidos por microrganismos e geneticamente modificados seja aceite como substituto do coagulante animal,

há um crescente interesse pelo coagulante de origem vegetal extraído de plantas (Shah et al., 2014; Shalabi & Fox, 1987a). As enzimas coagulantes, podem ser extraídas de quase qualquer tecido das plantas, e de um modo geral qualquer enzima proteolítica apresenta capacidade de coagular o leite, em condições específicas (Tamer & Mavituna, 1997).

O fabrico de queijo, com recurso ao coagulante de origem vegetal é próprio dos países Mediterrâneos, do oeste Africano e da Europa do Sul. Segundo Roseiro (2003), é na Península Ibérica, onde se encontram a maior variedade e produção de queijos, com uso do *Cynara* sp. como agente coagulante.

A proteólise é um dos processos bioquímicos, que ocorre ao longo da maturação dos queijos, sendo o mais complexo. Os agentes coagulantes, enzimas indígenas presentes no leite usado, enzimas provenientes da flora de arranque, enzimas da microflora secundária e proteases e peptidases exógenas, são os agentes potenciadores deste processo (Fox, 1993a; M. J. Sousa, Ardö, & McSweeney, 2001).

Por forma, a estudar a proteólise, procuraram-se as técnicas que melhor permitiam, o conhecimento e estudo do perfil proteico dos queijos de Évora.

Vários métodos de estudo têm sido utilizados para o estudo da proteólise como, métodos específicos e não-específicos (Tejada, Abellán, Cayuela, Martínez-Cacha, & Fernández-Salguero, 2008). Nesta dissertação iremos abordar os métodos específicos de estudo da proteólise, mais concretamente as técnicas eletroforéticas.

Deste modo, foram estudadas duas frações proteicas, as caseínas, que constituem a fração proteica insolúvel em água e as proteínas constituintes da fração solúvel em água, do queijo. A fração proteica insolúvel, de acordo com a bibliografia é expectável que seja constituída por caseínas, as proteínas específicas do leite e queijo. Uma vez que a degradação das caseínas tem por base um processo de hidrólise, podemos supor a existência que produtos da degradação das caseínas, como péptidos de pequenas dimensões e aminoácidos, na fração proteica solúvel. No entanto nas primeiras fases de cura é igualmente expectável que se observem proteínas constituintes do soro do queijo.

Neste trabalho, dar-se-á ênfase à análise do perfil proteico dos queijos pelos métodos eletroforéticos, uni e bidimensionais.

Como objetivo inicial procurou-se a otimização da técnica de extração das caseínas, bem como testar e otimizar a técnica eletroforética que melhor permite o estudo do perfil proteico, desta fração. Neste caso, as técnicas de SDS-PAGE e ureia-PAGE foram comparadas.

Numa segunda abordagem avaliou-se a proteólise dos queijos de Évora, tendo como amostra controlo, queijos fabricados com agente coagulante animal e comparam-se os efeitos de diferentes ecótipos de cardo do agente vegetal *Cynara cardunculus* L. Esta avaliação passou por estudar ambas as frações proteicas do queijo, por técnicas eletroforéticas, unidimensional para a fração de caseínas e bidimensional para a fração proteica solúvel em água.

Esta abordagem de avaliação da proteólise, com o uso de duas técnicas eletroforéticas permite observar em ambas as frações a degradação proteica das caseínas, bem como os produtos que resultam da hidrólise das diferentes isoformas destas proteínas. Para a separação da fração insolúvel em água, ou seja, a fração de caseínas, utilizou-se a técnica de ureia-PAGE.

A técnica de eletroforese bidimensional, foi utilizada de modo a permitir observar compostos presentes em menores quantidades, que, em géis unidimensionais, seriam mascarados pela presença de outras proteínas/péptidos com massas moleculares ou pontos isoeletricos semelhantes. Isso, com o objetivo de melhor caracterizar as proteínas/péptidos que estão presentes na fração solúvel em água, ao longo das diferentes fases de maturação do Queijo de Évora.

Com este procedimento foi possível comparar os perfis de caseínas e de proteínas presentes na fração solúvel em água entre queijos obtidos através da utilização de diferentes agentes coagulantes, nomeadamente três ecótipos de cardo (*Cynara cardunculus* L.), de modo a avaliar a sua capacidade tecnológica na produção de Queijo de Évora DOP.

2. Revisão Bibliográfica

2.1. O Queijo de Ovelha e seu Processo de Fabrico

O queijo é constituído por água e uma fração sólida, que se designa por resíduo seco. Este resíduo seco é constituído por gordura, proteína, lactose e minerais (Fox 1993a). Tradicionalmente, os queijos de ovelha apresentam um processo de fabrico mais artesanal, podendo conferir-lhe características próprias que os distinguem e valorizam, sendo produzidos em pequena quantidade e vendidos na região do seu fabrico, essencialmente.

As várias fases do fabrico dos queijos, bem como todas as alterações bioquímicas que sucedem, influenciam fortemente as características organolépticas e reológicas do queijo. O processo de produção do queijo, nomeadamente do queijo de ovelha, apresenta duas fases: (1) uma fase inicial que compreende efetivamente o processo de fabrico e uma segunda fase, (2) a maturação (Fox, 1993a).

O processo de fabrico do queijo de ovelha, como se observa na Figura 1, inicia-se pela filtração do leite e armazenamento em tanques de refrigeração, com temperatura normalmente de 3-4°C. Seguidamente e tendo em conta a variedade de queijo de ovelha que se pretende fabricar, este pode ou não ser pasteurizado. Uma vez preparado leite, é adicionado o agente coagulante, podendo ser de origem vegetal, *Cynara cardunculus* L., para os queijos de leite de ovelha. Este agente coagulante antes de adicionado ao leite, é preparado, sendo colocado em água e repousando durante algumas horas. De seguida é pisado num almofariz e filtrado, sendo adicionado ao leite, o extrato aquoso. Por norma, o leite coagula após 1 hora e 30 minutos formando um gel que irá originar a coalhada. A etapa seguinte, designa-se por dessoramento onde a massa formada pode ser agitada lentamente, promovendo a separação do soro da coalhada. Por fim, a coalhada é colocada e acondicionada em moldes, os cinchos, e pressionada de modo a retirar o restante soro (F. Silva, Lopes, & João, 2001).

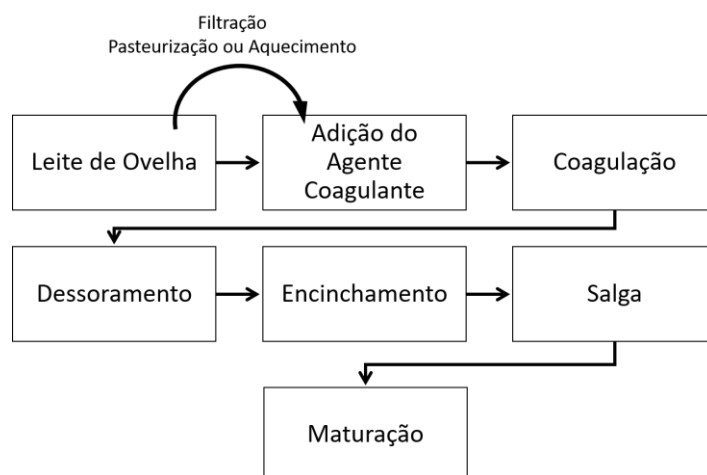


Figura 1 - Processo de Fabrico do Queijo de Ovelha. (Dias, 1997; F. Silva et al., 2001; Veloso, 2001).

A segunda fase, como referida, designada por maturação, consiste em várias alterações bioquímicas (glicólise, lipólise e proteólise) que ocorrem devido à ação catabólica de vários agentes.

Mais especificamente e tendo em conta o objetivo principal deste trabalho, iremos focar a revisão bibliográfica sobre o Queijo de Évora DOP (Denominação de Origem Protegida), particularmente a ação do agente coagulante na degradação das proteínas (proteólise).

O Queijo de Évora DOP (Figura 2), é um queijo curado, de pasta dura ou semi-dura, com uma tonalidade amarelada que é produzido a partir de leite cru de ovelha. É um queijo obtido por esgotamento da coalhada, após coagulação do leite de ovelha com uma infusão de *Cynara cardunculus* L., apresentando uma crosta bem formada, lisa ou ligeiramente rugosa (Despacho 29/94 de 4 de Fevereiro, 1994).

O Queijo de Évora, apresenta normalmente um tamanho de cerca de 6 a 8 cm de diâmetro e sensivelmente uma altura de 3 a 4 cm, com um peso variável entre 60 a 90 g.

Quanto ao seu aroma apresenta-se ligeiramente picante e acidulado, podendo estar associado, pelo elevado poder proteolítico do coagulante de origem vegetal como sugerem inúmeros autores (Delgado, Rodríguez-Pinilla, González-Crespo, Ramírez, & Roa, 2010a; Shah et al., 2014).



Figura 2 - Queijo de Évora DOP.

Deste modo, o Queijo de Évora DOP, é produzido numa área restrita, abrangendo todo o distrito de Évora, e de uma forma mais específica os concelhos de Alandroal, Arraiolos, Avis, Borba, Estremoz, Évora, Fronteira, Montemor-o-Novo, Mourão, Portel, Redondo, Reguengos de Monsaraz, Sousel, Vendas Novas, Viana do Alentejo e Vila Viçosa, como é possível observar na Carta Administrativa Oficial de Portugal da DGT (2013) (Figura 3).



Figura 3 - Área geográfica de produção do Queijo de Évora DOP. (Carta administrativa Oficial de Portugal da DGT, versão 2013).

Este queijo apresenta teores de gordura entre os 45 e os 60% do extrato seco, sendo por isso um queijo gordo.

Para o fabrico do queijo de Évora, como referido anteriormente, o leite usado é de ovelha e não sofre qualquer tipo de pasteurização.

Deste modo, segundo o Despacho 29/94 de 4 de Fevereiro (1994), devem ser mantidos, na sala de cura, a um intervalo de temperatura entre os 8 e os 15°C e a uma humidade que varia entre os 80 e 95%. O tempo de maturação varia de acordo com o tipo de pasta que se pretende, embora devido ao facto do queijo ser fabricado com leite cru de ovelha, o tempo mínimo de maturação é de 30 dias. Assim, para um queijo de pasta semi-dura, o queijo é consumido com 30 dias de cura e para um queijo de pasta dura, deve ser consumido após um período de 90 dias de cura.

2.2. Coagulação e Agentes coagulantes

O processo da coagulação do leite envolve muitas alterações físico-químicas, nas micelas das caseínas (Figura 4), promovendo a formação de uma rede proteica, que constitui o gel que dá origem, após várias operações, ao queijo (Pires et al., 1994; M. J. C. F. de Sousa, 1993).

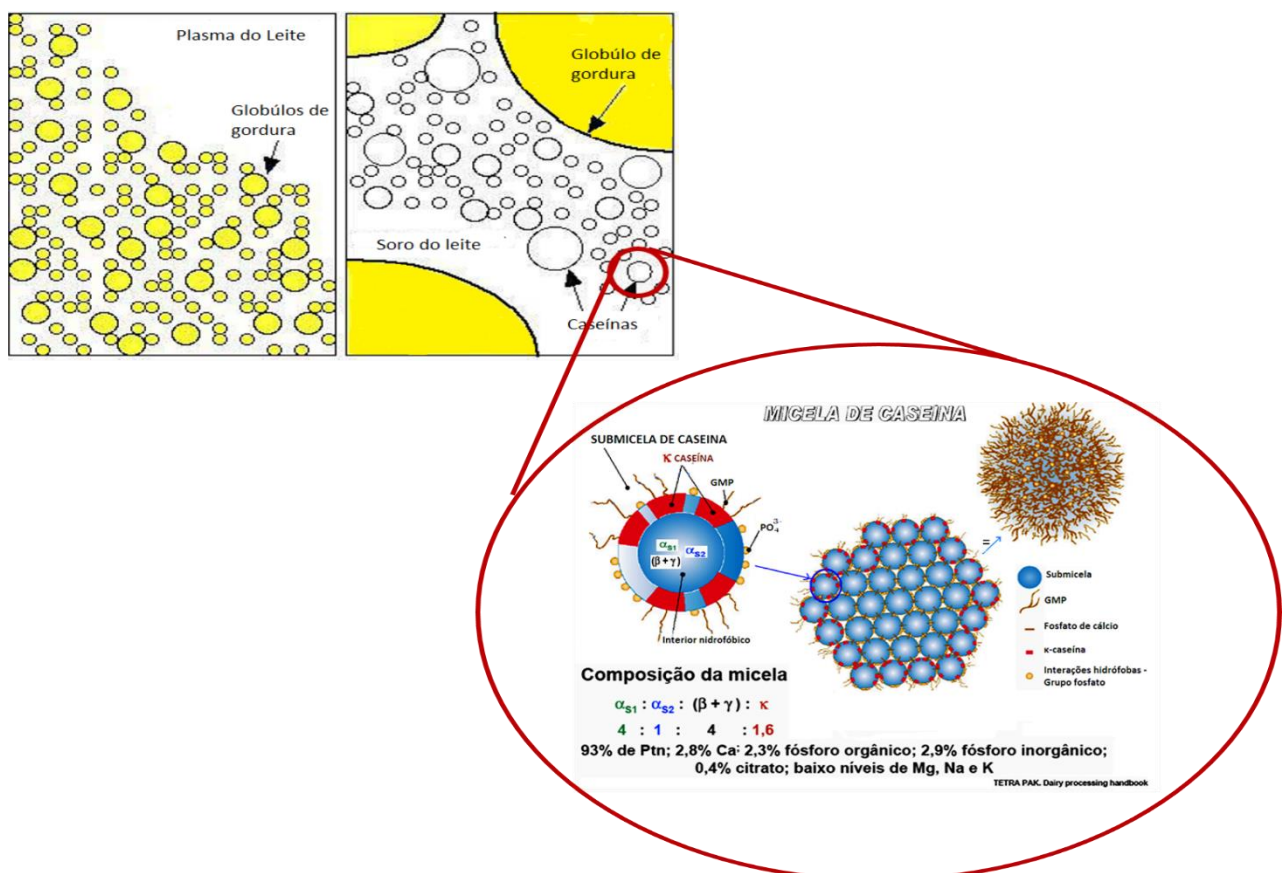


Figura 4 - Estrutura Micelar (Cristian M. de Magalhães, 2017; "Milk Composition Physicochemical Properties," n.d.).

O processo de coagulação, tem por base a hidrólise da ligação Phe₁₀₅-Met₁₀₆. A coagulação compreende duas fases, resultando da primeira, a fase enzimática, a destabilização das micelas da caseína do leite, promovendo a quebra da k-caseína em dois segmentos. Estes segmentos apresentam-se desiguais e constituem a para-k-caseína e um segmento caseinomacropeptídeo, a parte mais hidrofóbica da k-caseína. O segmento caseinomacropeptídeo dissolve-se no soro, perdendo-se a sua ação suavizante (Dalglish, 1993).

Sendo a k-caseína responsável pela estabilização das micelas de caseína, a sua hidrólise destabiliza as micelas residuais, coagulando na presença de uma concentração crítica de Ca²⁺ e temperaturas de aproximadamente 20°C (Fox, 1993a).

A segunda fase, a fase não enzimática, consiste na agregação das micelas desagregadas na fase anterior (Fox, 1993a), pela libertação destes segmentos. Promove, uma agregação das micelas destabilizadas, originando um gel lácteo, que retém a gordura, água e componentes solúveis no leite. Este gel ao amadurecer dá origem ao queijo (Ordiales et al., 2013a). Na figura 5 é possível observar o processo de coagulação tendo em conta a atividade proteolítica da enzima coagulante. Deste modo, a ação de enzimas coagulantes, que apresentam elevada atividade proteolítica dá origem a péptidos que conferem aroma amargos, sabores indesejáveis e menor rendimento do queijo.

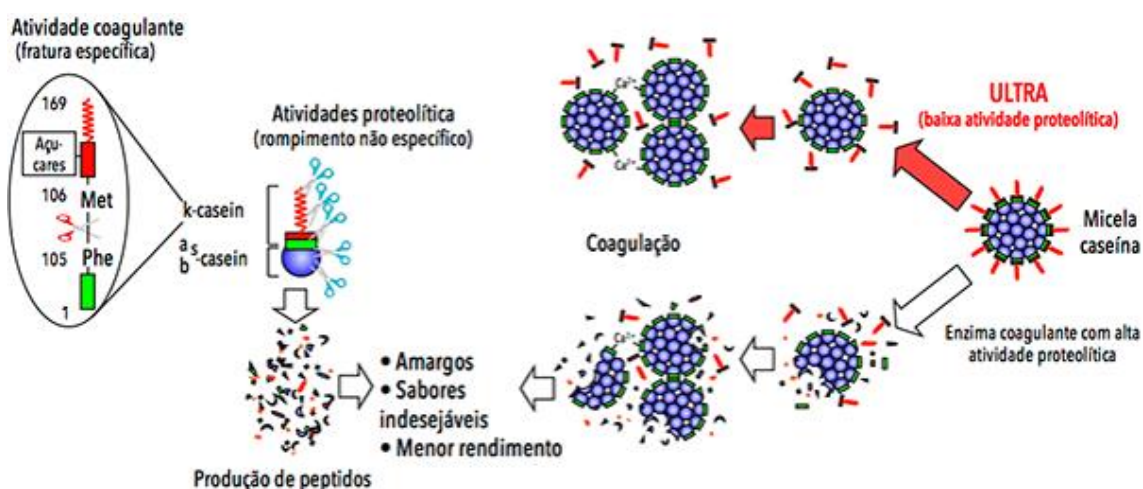


Figura 5 – Processo de Coagulação (<https://es.slideshare.net/FUSADESORG/4-coagulantes-en-la-industria-lactea>)

A capacidade específica de hidrolisar a k-caseína, é a propriedade de maior importância de uma enzima capaz de coagular o leite (Mandy Jacob, Jaros, & Rohm, 2011).

A maioria das enzimas usadas para a coagulação do leite, são proteases aspárticas, no entanto, outras como as cisteínicas e serínicas, também apresentam capacidade de coagulação do leite (Shah et al., 2014).

Fatores como o agente coagulante, a proporção das enzimas coagulantes entre si, o variedade de queijo fabricado, a temperatura de fabrico e o teor de humidade que o queijo apresenta, influenciam a percentagem de atividade coagulante que permanece na coalhada após o fabrico, uma vez que grande parte é eliminada com o soro do queijo (M. J. Sousa et al., 2001).

Define-se como tempo de coagulação, o tempo decorrido desde a adição do agente coagulante até à formação dos primeiros flocos de gel. Sucede-se um fenómeno de sinérese, que consiste numa retração da rede proteica e perda de soro, ocorre muito rapidamente e é extremamente sensível às condições de fabrico (Green & Grandison, 1993).

Esta fase, bem como a sua velocidade, apresentam extrema importância na formação e características do queijo (Lenoir e Schneid, 1987, citado por Jorge, 1995).

Segundo os mesmos autores, a concentração em caseínas e os teores em cálcio solúvel e em fosfato de cálcio coloidal, propriedades intrínsecas ao leite, determinam o tempo que o leite demora a coagular bem como as características reológicas do coágulo. No entanto, esta influência da concentração em caseínas, no tempo de coagulação é fraca. A concentração de caseínas no leite apresenta-se diretamente proporcional à firmeza do gel, deste modo se a concentração desta fração proteica for mais baixa, a firmeza do gel é afetada negativamente, verificando-se igualmente o inverso.

O tempo de coagulação, bem como a firmeza do gel são igualmente influenciados pelas variações de pH. Para valores de pH inferiores ao do leite, o tempo de coagulação apresenta-se mais curto e a firmeza do gel é mais elevada,

por outro lado, quando o pH se apresenta superior a 7, o processo de coagulação deixa de existir pela inativação da enzima (Jorge, 1995).

Para o fabrico de queijo, recorre-se a agentes coagulantes de três tipos: agentes coagulantes de origem animal, vegetal e microbiana.

2.2.1. Agentes coagulantes de origem animal

Os coagulantes de origem animal, principalmente a quimosina bovina, são muitos usados na coagulação do leite, para a produção de queijos, com sabor e textura caraterísticos (Neelakantan, Mohanty, & Kaushik, 1999).

As enzimas coagulantes de origem animal, presentes no estômago de ruminantes jovens, como bovinos e ovinos, e em suínos e aves, são os que mais se utilizam para o fabrico de queijo, tendo em conta que exibem um elevado teor de quimosina (Mandy Jacob et al., 2011). Mais vulgarmente utilizado são os extratos retirados do quarto e último compartimento do sistema digestivo de bovinos jovens, o abomaso de bezerros e vitelos.

Fatores como a idade e o regime alimentar destes animais, determina o teor e composição em quimosina e pepsina do seu estômago, as duas enzimas com capacidade proteolítica. A relação quimosina/pepsina varia principalmente com a idade dos animais, sendo que em fases mais jovens, extratos do abomaso destes animais, apresentam teores de quimosina na ordem de 80-90% e de pepsina de 10-20%. À medida que o animal cresce o valor da pepsina, sofre alterações, podendo aumentar para valores de 90%. Sendo por isso, que os animais dos quais se retira estes agentes coagulantes, encontram-se na fase de lactação (M. J. Sousa et al., 2001).

Comparando a quimosina e a pepsina, esta última apresenta uma maior suscetibilidade às variações de pH. Deste modo, o pH a que se encontra o leite influencia fortemente a atividade coagulante presente na coalhada (Fox & McSweeney, 1996).

A quimosina apresenta uma função de coagulação, por ação de hidrólise, sobre a fração de caseínas do leite, mais especificamente sobre a ligação Phe₁₀₅-Met₁₀₆ da proteína organizada estruturalmente em micelas, a k-caseína,

sendo esta proteína, entre as restantes, a mais suscetível à ação da quimosina (Fox, Guinee, Cogan, & McSweeney, 2000).

2.2.2. Agentes coagulantes de origem microbiana

A crescente produção de queijo, bem como a reduzida quantidade de coalho de animais jovens disponível, contribuiu para a procura de enzimas substitutas do coalho animal. Deste modo, verifica-se um crescente desenvolvimento da produção de queijo com recurso a enzimas microbianas como agente coagulante (Neelakantan et al., 1999). Segundo os mesmos autores, inúmeros microrganismos, apresentam protéases com a capacidade de coagulação do leite, semelhante ao coagulante de origem animal, como *Rhizomucor pusillus*, *R. miehei*, *Endothia parasitica*, *Aspergillus oryzae* e *Lrpex lactis*.

As enzimas que apresentam uma ação semelhante à da quimosina podem ser encontradas em fungos filamentosos. No entanto, estas têm um elevado poder proteolítico, para o uso como coagulantes, produzindo queijos de baixa qualidade (Pinheiro, 2002).

Agentes coagulantes produzidos a partir de microrganismos e organismos geneticamente modificados, constituem razoáveis substitutos para os agentes coagulantes de origem animal (Shah et al., 2014).

2.2.3. Agentes coagulantes de origem vegetal

Muitos dos queijos produzidos a partir de leite de ovelha, principalmente, os queijos produzidos em Portugal, Espanha, França e Itália, são produzidos com agentes coagulantes de origem vegetal. Este agente coagulante usado é extraído a partir de várias espécies do género *Cynara* L. (Fernández-Salguero & Sanjuán, 1999). Os queijos portugueses, Serra da Estrela e de Serpa (Martins, 1999), bem como o Queijo de Évora e Nisa, são produzidos com recurso à espécie *Cynara cardunculus* como agente coagulante do leite.

O uso do agente coagulante vegetal para a produção dos queijos, fabricados com leite de ovelha, é tradicionalmente usado, desde a ocupação da Península Ibérica pelos Romanos (Barbosa, 1983 citado por Martins, 1999).

Em Portugal, principalmente na zona sul do país, estas espécies de *Cynara* L. usadas, no fabrico de queijo, encontram-se em terrenos pedregosos e solos danificados, crescendo de forma espontânea. As plantas da espécie *Cynara*, apresentam na sua constituição enzimas, como as cinarases e ciproquinas, bem como as cardosinas A e B (P Veríssimo et al., 1996; Paula Veríssimo, Esteves, Faro, & Pires, 1995) que apresentam uma elevada atividade coagulante do leite, uma vez que são capazes de quebrar a k-caseína, bovina e ovina, numa ligação peptídica específica, Phe₁₀₅-Met₁₀₆ (Fernández-Salguero & Sanjuán, 1999). Quando comparadas com as enzimas constituintes do coagulante de origem animal, a cardosina A apresenta um comportamento semelhante à quimosina, no que respeita à sua especificidade e atividade, sendo que a cardosina B assemelha-se à pepsina (Paula Veríssimo et al., 1995). De uma forma mais específica a cardosina A é a enzima responsável pela quebra específica da ligação peptídica referida, sendo que a cardosina B apresenta uma menor especificidade na sua ação proteolítica (S. V Silva & Malcata, 2005).

Para a produção de queijo as duas espécies que mais se utilizam são *Cynara Cardunculus* L. (Figura 6) e *Cynara humilis* L. (Figura 7). A primeira espécie, existe em menor quantidade, sendo cultivada por alguns produtores para o fabrico do queijo Serra da Estrela, onde é muito apreciado e valorizado o seu uso. A espécie *Cynara humilis* L., encontra-se de forma mais abundante na Zona Centro e Alentejo (Pires et al., 1994).



Figura 6 - *Cynara cardunculus* L.
(<http://irapl.altervista.org/cpm/albums/bot-units155/cynara-cardunculus-subsp-cardunculus30212.jpg>)



Figura 7 - *Cynara humilis* L.
(<http://floresdoareal.blogspot.pt/2011/08/cynara-humilis-l.html>)

O uso deste extrato aquoso, na produção de queijos, confere também, características e propriedades específicas, tornando-os num produto tradicional muito apreciado (Martins, 1999).

Segundo Vieira de Sá (1974) e Barbosa (1983), citado por Martins (1999) os componentes da planta, *Cynara cardunculus*, que apresentam uma tonalidade azul-violeta, é de onde são extraídos as proteases coagulantes (Figura 8).



Figura 8 - Pistilos da planta Cynara cardunculus L., recolhidos para uso como agente coagulante no processo de fabrico do queijo de ovelha.

Segundo Shah *et al.* (2014), vários métodos têm sido utilizados para a extração das enzimas coagulantes a partir das plantas da espécie *Cynara* L.. O método mais usual para a extração destas enzimas, é por leve maceração de vários órgãos da planta como as flores, sementes, raízes e folhas.

Quando usadas as flores ou folhas desta planta, procede-se à sua secagem e maceração, sendo posteriormente colocadas em água e filtradas após algum tempo que varia, entre autores. O resultado da filtração é o extrato aquoso, que é usado geralmente como coagulante (Roseiro, Barbosa, Ames, & Wilbey, 2003a).

É variável a quantidade utilizada de flores da planta *Cynara* e água, dependendo da quantidade de leite a usar, qualidade visual da flores secas e da experiencia do queijeiro (Roseiro et al., 2003a).

Para os queijos produzidos com leite de ovelha, os mesmos autores, referem que o extrato aquoso, possível de extrair da planta *Cynara cardunculus* L. é o que apresenta melhores resultados tecnológicos. Para os queijos, com leite de bovino e caprinos, o mais usado e indicado, serão os coagulantes de origem animal.

Segundo Sousa e Malcata (2002), as flores da planta são moídas, usando sal de cozinha e envolvidas num pano de algodão. A planta envolta neste pano é mergulhada na tina onde se encontra o leite aquecido, de acordo com as características específicas do processo de fabrico do queijo de Serra da Estrela. Este constitui um método alternativo de extração das enzimas coagulantes.

Os queijos produzidos com leite de ovelha e nos quais é usado o extrato aquoso de *Cynara cardunculus* L., no seu fabrico como agente coagulante, têm demonstrado apresentar um sabor ligeiramente amargo e uma textura menos consistente (Delgado et al., 2010a), podendo ser explicado pelo excessivo poder proteolítico que as enzimas vegetais apresentam (Shah et al., 2014).

Os autores Pino *et al.* (2009) sugerem também o interessante uso destas enzimas coagulantes, devido ao seu caráter natural e vegetal, podendo ser usado na produção de queijos que integram uma dieta vegetariana.

2.3. A Maturação

A maturação dos queijos, apresenta elevada complexidade, e inúmeros processos químicos e bioquímicos, que contribuem para a aquisição do sabor e gosto, bem como características de textura do queijo (M. J. Sousa et al., 2001).

As principais reações bioquímicas que ocorrem, neste processo são lipólise, a glicólise e a proteólise, que são reguladas pela ação catabólica de vários agentes: o coagulante; as enzimas do leite, mais especificamente proteases e lipases (particularmente importantes nos queijos produzidos com leite cru); enzimas de arranque e microflora secundária (Fox, 1993a).

2.3.1. Proteólise

A proteólise é um dos processos bioquímicos, que ocorre ao longo da maturação dos queijos, sendo o mais complexo. Agentes coagulantes, enzimas indígenas presentes no leite (plasmina, catepsina D e proteases de células somáticas), enzimas provenientes da flora de arranque, enzimas da microflora secundária e proteases e peptidases exógenas, são os agentes potenciadores deste processo (Fox, 1993a; M. J. Sousa et al., 2001). O tipo e a atividade

específica dos agentes coagulantes, a composição química e a matriz do queijo influenciam especificamente a profundidade bem como a extensão da proteólise (Juan, Ferragut, Buffa, Guamis, & Trujillo, 2007). Como consequência verificam-se sobretudo alterações na textura à matriz do queijo, uma vez que ocorre a quebra das ligações proteicas.

Segundo Fox (1993) e Sousa *et al.* (2001) a quebra das ligações que constituem a rede proteica do queijo, a libertação de água e aumento de pH, intrínsecos ao processo da proteólise, condicionam a textura, sabor e aroma do mesmo.

Como revisto por Silva e Malcata (2005), durante o processo de coagulação do leite, no qual se forma a coalhada, há uma perda de grande parte do agente coagulante pelo soro que se liberta. Ainda assim, uma fração menor do agente coagulante que é retido na coalhada é responsável pela proteólise inicial.

No início deste processo proteolítico, dá-se a degradação das caseínas, por hidrólise, como resultado da ação do agente coagulante e da plasmina. No entanto, a hidrólise resultante da ação desta enzima, é menos representativa. Tendo em conta a variedade de queijo e principalmente devido ao seu processo de fabrico, existem variedades de queijos nas quais a plasmina apresenta uma forte influência na hidrólise inicial, uma vez que pela aplicação de uma elevada temperatura no processo de fabrico há uma elevada desnaturação do agente coagulante (Sousa *et al.* 2001), como por exemplo no queijo Parmigiano-Reggiano e em queijos suíços. Da hidrólise da fração de caseínas, surgem cadeias polipeptídicas de maiores dimensões, as quais são insolúveis em água, e cadeias de um tamanho menor, as quais constituem péptidos solúveis em água. Este processo designa-se por proteólise primária. Por sua vez, estes péptidos sofrem uma constante degradação por ação de peptidases e proteases de microrganismos, enzimas da flora de arranque e da flora secundária (Fox, 1993a; M. J. Sousa *et al.*, 2001), presente no queijo, sendo esta designada por proteólise secundária. Assim, de acordo com Veloso (2001), no início, a fração de caseínas dos queijos apresenta-se insolúvel e insípida, sendo que ao longo

da proteólise, e à medida que esta fração se degradada, são formados péptidos de menor dimensão e aminoácidos livres, os quais são solúveis (Figura 9).

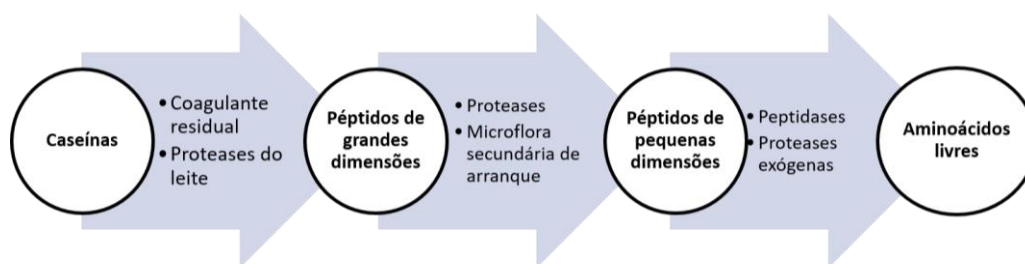


Figura 9 - Agentes potenciadores da proteólise durante a maturação do queijo. Adaptado de Sousa et al. (2001).

A concentração de aminoácidos livres no queijo, a qual resulta da proteólise, varia de acordo com a extensão da degradação das caseínas, bem como da síntese pela microflora presente no queijo.

A contínua degradação dos aminoácidos livres, observada na Figura 10, pode ser resultado da ação dos microrganismos presentes no queijo, e como consequência a libertação de substratos por alterações catabólicas secundárias (transaminação, desaminações oxidativas, descarboxilação, dessulfuração, reduções, degradações e oxidações) conferido um sabor característico ao queijo (Fox, 1993b; Perry, 2004; M. J. Sousa et al., 2001).

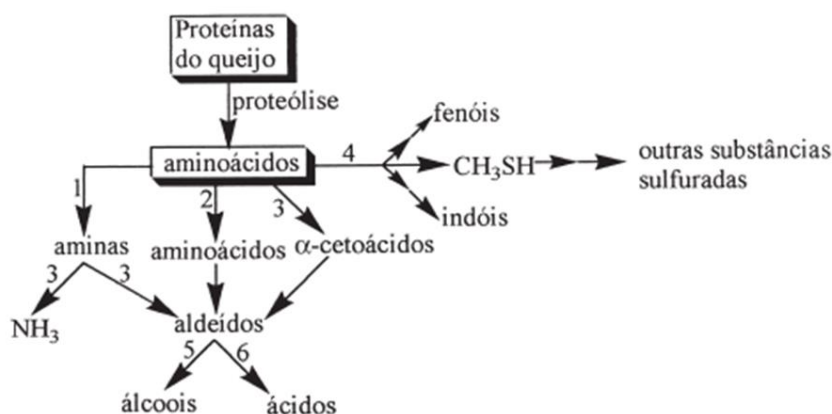


Figura 10 – Esquema geral da proteólise resultante da ação microbiana durante a maturação dos queijos: 1- descarboxilação; 2-transaminações; 3-desaminações oxidativas; 4-degradações; 5-reduções; 6-oxidações (Perry, 2004).

É possível observar que como resultado da degradação das caseínas, ou seja, a diminuição da concentração das mesmas ao longo da maturação, há um aumento do nível de péptidos solúveis como produtos da hidrólise das mesmas,

na fração solúvel em água (Delgado, Rodríguez-Pinilla, González-Crespo, Ramírez, & Roa, 2010b; Ordiales et al., 2013b).

Inúmeros investigadores que têm avaliado a proteólise de queijos com recurso a várias técnicas de eletroforese distinguiram algumas frações de caseínas. Estas são designadas como γ -caseínas, β -caseína, α_s -caseína e pré- α_s -caseínas (Delgado et al., 2010b; Fernández-Salguero & Sanjuán, 1999; Pino, Prados, Galán, McSweeney, & Fernández-Salguero, 2009a; Veloso, Teixeira, & Ferreira, 2002).

Os autores Juan *et al.* (2007) que estudaram a proteólise primária em queijo produzidos com leite de ovelha concluíram que ao longo da maturação há uma elevada degradação da α_s -caseína, ou seja, uma diminuição dos níveis residuais desta caseína. Por outro lado, a β -caseína apresenta uma menor degradação ao longo do processo da maturação. Outros autores sugerem que a menor degradação da β -caseína deve-se à resistência que esta apresenta à hidrólise (Delgado et al., 2010b; Fernández-Salguero & Sanjuán, 1999; Ordiales et al., 2013b; Pino et al., 2009a). Fernández-Salguero *et al.* (2009) concluíram, para o queijo “Torta del Casar” (um queijo produzido com leite de ovelha) que a α_s -caseína apresenta uma menor degradação nas fases iniciais da maturação, até aos 30 dias de cura, quando comparada como a degradação que ocorre entre os 30 e 60 dias de cura. Os mesmos autores referem um comportamento oposto relativamente à degradação da β -caseína, degradando-se mais extensivamente nos primeiros 30 dias de cura quando comparado com o restante tempo de maturação, onde apresentam uma degradação menos extensa e mais constante. Os mesmos autores sugerem ainda que a hidrólise da α_s -caseína apresenta uma maior contribuição para o aumento de compostos azotados de baixo peso molecular, na fração solúvel, quando comparada com a hidrólise da β -caseína. É consensual para os investigadores que a β -caseína apresenta uma menor suscetibilidade à proteólise que a α_s -caseína (Delgado et al., 2010a; Fernández-Salguero & Sanjuán, 1999; Ordiales et al., 2013b; Pino, Prados, Galán, McSweeney, & Fernández-Salguero, 2009b; Roseiro, Barbosa, Ames, & Wilbey, 2003b).

As pré- α_s -caseínas, segundo Fernández-Salguero *et al.* (2009), são as caseínas que resultam da degradação da α_s -caseína.

Num estudo realizado por autores Delgado *et al.* (2010) foi analisada a proteólise e as alterações de textura no queijo “Torta del Casar” em diferentes fases de maturação (1, 30, 60 e 90 dias de cura). Os autores estudaram as duas frações proteicas do queijo: a fração proteica insolúvel, constituída principalmente por caseínas; e a fração proteica solúvel em água que inclui outras proteínas, péptidos, aminoácidos e compostos de baixas massas moleculares de N (aminas, ureia e amónio). Tendo este queijo como matriz, os investigadores usaram o índice de maturação, ou seja, a proporção de azoto solúvel total (SN/TN), permitindo avaliar a extensão da proteólise. Deste modo, concluíram que os valores de SN/TN apresentaram um aumento significativo após os 60 dias de cura, tendo sido semelhantes na última fase de cura estudada (90 dias). Assim concluíram que há uma diminuição dos péptidos de elevado peso molecular e caseínas ao longo das fases de maturação estudadas, aumentando a concentração de péptidos menores e aminoácidos livres.

Testando o efeito do agente coagulante vegetal na proteólise do queijo “Torta del Casar”, os investigadores Ordiales *et al.* (2013), concluíram inicialmente que a fração de caseínas no queijo foi degradada ao longo do processo de maturação, diminuindo a sua quantidade. Como resultado desta degradação o nível de proteínas solúveis em água, apresenta-se mais elevado aos 60 dias quando comparado com o nível proteico aos 2 dias de cura. Os autores sugerem que este facto se relaciona com a degradação das caseínas por hidrólise, uma vez que desta degradação, resultam péptidos solúveis em água.

Relativamente à identificação dos constituintes da fração solúvel em água, pouca bibliografia existe, sendo relevante o trabalho dos autores Sousa *et al.* (2001) que fazem uma pequena revisão sobre as frações solúveis e insolúveis em água, que podem ser obtidas por métodos de extração proteica.

A fração solúvel em água do queijo, apresenta proteínas com elevada sensibilidade ao calor, que podem formar novos complexos, quando sujeitos a um pequeno aumento da temperatura (Veloso, 2001). Estas caseínas são denominadas por vários autores (Fernández-Salguero & Sanjuán, 1999; Ordiales

et al., 2013b; Pino et al., 2009a; Veloso et al., 2002), as γ -caseínas, que são produto da proteólise da β -caseína (Veloso, 2001).

Vários estudos têm procurado, isolar péptidos, provenientes da hidrólise das caseínas e de proteínas da fração solúvel em água, que apresentam diferentes aplicações biológicas (Veloso, 2001).

2.3.2. Influência do agente coagulante na proteólise dos queijos.

Inúmeros estudos têm sido feitos para comparar o efeito do agente coagulante na proteólise no queijo.

Fernández-Salguero e Sanjuán (1999), compararam a influência do coagulante vegetal, *Cynara cardunculus* L. e de coagulante animal na proteólise durante a maturação de queijo de ovelha. Estes investigadores concluíram que os níveis relativos iniciais de α_s -caseína, diminuíram nos dois tipos de queijo, no entanto a proporção desta caseína, foi superior nos queijos com coagulante vegetal, bem como um decréscimo mais acentuado, relativamente aos queijos em que foi usado coagulante animal.

Os queijos foram analisados em três fases distintas da maturação (60, 80 e 100 dias de cura). Os valores de β -caseína apresentaram uma diminuição bastante ligeira, e maior nos queijos com coagulante animal. A quantidade residual desta caseína é bastante superior à da α_s -caseína, explicando-se pela sua elevada resistência à hidrólise. Os valores residuais α_s -caseína apresentam-se superiores, nos queijos com agente coagulante animal (Fernández-Salguero & Sanjuán, 1999).

Do mesmo modo, num estudo realizado com queijo de leite de ovelha cru, fabricado com coagulante animal e vegetal, *Cynara cardunculus* L., observou-se que a hidrólise das caseínas foi mais extensa nos queijos produzidos com coagulante vegetal (Fernández-Salguero & Sanjuán, 1999).

Comparando as caseínas, segundo a extensão e velocidade da sua degradação, em queijos de “Torta del Casar” fabricados com agentes coagulantes vegetais, a β -caseína apresenta uma maior velocidade de degradação, nos primeiros 30 dias de maturação. Sendo que a partir deste

momento, a degradação é mais ligeira e constante. No entanto a α_s -caseína degrada-se de forma mais extensa e mais acentuada na fase final da maturação (90 dias) do queijo “Torta del Casar” (Delgado et al., 2010a).

Este autor refere também resultados, de um estudo realizado com queijo Roncal e de Serpa, dos investigadores Irigoyen *et al.* (2000) e Roseiro *et al.* (2003), respetivamente, em que observaram que o processo de hidrólise da α_s -caseína foi mais rápido que a da β -caseína, entre os 0 e 30 dias de cura. No entanto tal pode ocorrer, pelo uso de coagulante animal no fabrico de queijo Roncal e devido ao curto período de maturação do queijo de Serpa, que é de 30 dias (Delgado et al., 2010a).

Outros investigadores, como Galán *et al.* (2008), compararam diferentes quantidades de coagulante vegetal em pó, extraído da planta *Cynara cardunculus* L. e coagulante de origem animal no fabrico de queijos de ovelha. Analisaram as suas características químicas, bioquímicas e sensoriais ao longo da maturação (6 meses). Observaram diferenças significativas entre os dois tipos de agente coagulante, sendo que a proteólise se observou mais extensa e de maior intensidade com o agente coagulante vegetal, ou seja, houve uma maior degradação proteica. Outro estudo, em que o objetivo se assemelha, analisou queijos de cabra, sendo que os queijos, fabricados com os dois tipos de agente coagulante, apresentam diferenças significativas entre a sua constituição, tendo chegado às mesmas conclusões referidas anteriormente, ou seja, concluíram que os valores médios de azoto solúvel são superiores nos queijos fabricados com agente coagulante vegetal, quando comparado com os queijos produzidos com coagulante animal. Tal facto foi explicado pela maior hidrólise das caseínas. Deste modo, a proteólise é mais extensa nos queijos fabricados com recurso ao agente coagulante vegetal, *Cynara cardunculus* L. (Pino et al., 2009b).

Igualmente comparando os agentes coagulantes animal e vegetal (*Cynara cardunculus*), bem como usando uma mistura de ambos os coagulantes, numa proporção de 50:50, analisando as mesmas características, os autores Galán *et al.* (2012), concluíram novamente que os queijos com coagulante vegetal atingiram as características bioquímicas e sensoriais ideais mais rapidamente, podendo beneficiar a indústria dos produtos lácteos, em termos económicos de

energia e redução de custos. Num estudo realizado com o mesmo queijo, produzido através de leite cru de ovelha e com agente coagulante vegetal, a proteólise verificou-se mais intensa numa fase inicial da maturação, até aos 30 dias de cura, relativamente ao intervalo de tempo que se seguiu até aos 60 dias de cura. Também a α_s -caseína apresentou uma maior degradação que a β -caseína (Delgado et al., 2010a), sendo também observado por outros investigadores que esta última apresenta menor suscetibilidade à hidrólise (M. Sousa & Malcata, 1997).

Outros investigadores que avaliaram o azoto solúvel observaram que os queijos produzidos com coagulante vegetal, em todas as fases de maturação estudadas apresentaram valores superiores quando comparados com os valores observados nos queijos produzidos com coagulante de origem animal. Deste modo, como referido anteriormente a hidrólise das caseínas é mais elevada dos queijos com agente coagulante vegetal, ou seja apresenta uma proteólise mais extensa (E. Galán, Prados, Pino, Tejada, & Fernández-Salguero, 2008; Pino et al., 2009a).

Embora numa fase inicial da maturação os compostos azotados solúveis resultem da ação das proteases do agente coagulante vegetal, *Cynara cardunculus* (Elena Galán, Cabezas, & Fernández-Salguero, 2012), a ação dos microrganismos também promove a proteólise do meio para o final da maturação do queijo. Contudo Ordiales et al. (2013) ainda sublinha mais este efeito, afirmando que os compostos azotados que constituem a fração proteica solúvel surgem, no início do processo proteolítico como resultado da ação do agente coagulante. No entanto, no que respeita à restante ação proteolítica até ao fim da maturação, esta é devida à ação dos microrganismos presentes no queijo.

2.4. Métodos de estudo/análise da proteólise no queijo

A avaliação da proteólise dos queijos baseia-se, de um modo geral, em avaliar as alterações na fração pertencente às caseínas e as alterações na restante fração proteica. Tendo em conta que o ponto isoelétrico da maior parte das formas de caseínas é próximo de 4,6, estas precipitam a este valor de pH. Assim, o modo comumente utilizado para as separar da restante fração proteica dos queijos (referida como fração insolúvel) é a separação entre as frações solúvel e insolúvel a este pH, como referem os autores Shalabi e Fox (1987).

Para a escolha da fração a analisar, bem como o método ou técnica que melhor permite estudar a proteólise é necessário ter em conta uma série de fatores como: a disponibilidade de equipamentos e recursos, a variedade do queijo e o objetivo do estudo, como é referido pelos autores Sousa *et al.* (2001). Como referido pelos mesmos autores a proteólise é um processo de elevada complexidade, para o qual devem ser analisados o maior número de índices, de modo a descrever e compreender mais extensivamente este processo.

Para estudar a proteólise nos queijos, existem vários métodos que podem ser divididos em não-específicos e específicos.

Os métodos que permitem a quantificação das frações azotadas, sem identificação dos péptidos e proteínas que resultam da proteólise, são considerados métodos não específicos. Um dos casos é o método de Kieldahl que permite a quantificação do azoto total (Tejada et al., 2008).

A avaliação e quantificação do azoto solúvel, permite estudar a proteólise, de uma forma indireta, pela quantificação dos produtos azotados que resultam da degradação das caseínas, os quais são solúveis em água (McSweeney & Fox, 1997a), bem como a quantificação do azoto não proteico, através da avaliação do azoto solúvel em ácido tricloroacético (TCA) a 12% (Tejada et al., 2008).

Por outro lado, outros métodos específicos para avaliação da proteólise são: a preparação da fase aquosa dos queijos por centrifugação; quantificação de aminoácidos livres; técnicas de separação baseadas em massa molecular, como a ultra filtração e cromatografia de exclusão molecular; e métodos com

base na libertação de compostos ou grupos reativos (revisto por McSweeney & Fox, 1997).

A técnica de cromatografia líquida de alta performance em fase reversa (RP-HPLC) permite a separação dos péptidos com base nas suas propriedades hidrofóbicas e é frequentemente usada para obter os perfis peptídicos da fração do queijo solúvel a um pH de 4,6. (Guerreiro, Barros, Fernandes, Pires, & Bardsley, 2013; Mayer, Rockenbauer, Mlcak, & Mayer, 1998; M. J. Sousa et al., 2001).

Os investigadores Tejada *et. al.* (2008) analisaram queijo de cabra (Murcia al Vino), produzido com agente coagulante animal e vegetal, pela técnica de HPLC avaliando as alterações observadas nos péptidos hidrofílicos (HI) e hidrofóbicos (HO), observando que as suas concentrações bem como o seu rácio (HO/HI) são superiores em queijos fabricados com agente coagulante vegetal. Esta técnica é complementar à técnica de ureia-PAGE, que avalia a proteólise primária e secundária, concluindo que os produtos da degradação da β -caseína foram superiores nos queijos produzidos com coagulante animal.

A proteólise dos queijos pode ser avaliada através de várias metodologias diferentes, que podem ser usadas isoladamente, ou em combinação. Os autores Sousa *et al.* (2001) fizeram uma revisão sobre os métodos usados para avaliar a proteólise do queijo, mais especificamente para avaliar alterações na fração proteica das caseínas e na fração solúvel em água (produtos da hidrólise das caseínas). Estes autores referem o efeito dos diversos agentes potenciadores da proteólise, como a ação da plasmina, diferentes tipos de coagulantes ou o efeito das enzimas presente na microflora de arranque. Sendo que no caso do objetivo ser a comparação dos efeitos de diferentes agentes coagulantes concluíram poderem ser usadas técnicas como separação em gel de poliacrilamida com ureia (ureia-PAGE) e eletroforese capilar (CE), para a fração insolúvel em água, bem como sequenciação e identificação dos produtos da proteólise primária, para a fração solúvel. Assim, os métodos de estudo e análise, devem ser escolhidos tendo em conta as características e a matriz em estudo, sendo necessário, portanto uma correta adequação das técnicas à variedade de queijo em estudo. Igualmente para a escolha do esquema de

separação das frações proteicas, bem como as técnicas a utilizar devem considerar-se fatores como a disponibilidade de equipamentos, objetivo de estudo e as diferentes técnicas usadas pelos diversos investigadores, como referem os autores Sousa *et al.* (2001) na sua revisão sobre as técnicas para avaliação da proteólise.

Tendo em conta as técnicas os vários métodos usados para a separação proteica para avaliar a proteólise e de acordo com o objetivo da dissertação, irá abordar-se as várias técnicas de eletroforese para a separação proteica, como sendo a ureia-PAGE, SDS-PAGE, eletroforese bidimensional e eletroforese capilar (CE).

2.4.1. Técnicas eletroforéticas

A eletroforese foi utilizada pela primeira vez, pelo bioquímico sueco, Arne Tiselius, em 1937, e tem como suporte a teoria de dissociação de partículas, de Debye-Hückel-Onsager. Esta teoria defende que as partículas carregadas, movem-se, numa solução, segundo um campo elétrico aplicado, como revisto pelos autores Rocha *et al.* (2005). A mobilidade eletroforética (μ) é a razão entre a velocidade (v) da macromolécula e o potencial elétrico (E) que move a macromolécula.

$$\mu = \frac{v}{E}$$

Fatores como, a força do campo, a carga, o tamanho, a forma e tipo de moléculas, a força iónica, a viscosidade e a temperatura do meio, em que se encontram as proteínas, determinam a velocidade de migração das mesmas.

Em técnicas de eletroforese para estudo das proteínas, os compostos proteicos são aplicados nos géis e separados pela aplicação de um campo elétrico, ao longo do gel (Berkelman & García-Carreño, 2001). Para que estas moléculas se movimentem ao longo desse campo elétrico é necessário que os mesmos apresentem carga elétrica, o que pode ser conseguido através da sua carga nativa para vários valores de pH, ou através da adição de detergentes que conferem uma carga artificial às proteínas.

Num sistema de eletroforese, um dispositivo diferencial de energia elétrica cria um campo elétrico, que atravessa o gel. As proteínas desnaturadas ou na sua forma nativa (consoante o tipo de eletroforese utilizada) são colocadas em poços, e migram do polo negativo (cátodo) para o polo positivo (ânodo).

A facilidade que, os géis de poliacrilamida, apresentam em ser corados, com corante azul de *Comassie*, nitrato de prata ou outros corantes, e a regulação da sua porosidade, pela proporção de acrilamida e bis-acrilamida, levam a que sejam bastante utilizados na separação de compostos proteicos (Rocha et al., 2005).

Alguns métodos eletroforéticos têm sido utilizados para estudar e detetar possíveis adulterações nos produtos lácteos. De uma forma mais específica têm sido utilizados para identificar adulterações em queijos produzidos com leite de diferentes espécies animais. Isto porque esta técnica permite uma boa separação dos grupos individuais de proteínas do leite, bem como permite a deteção de variações genéticas da proteína (Borková & Snášelová, 2005). Ou seja, através desta técnica é possível visualizar, em posições do gel diferentes, isoformas da proteína proveniente de diferentes espécies animais, uma vez que as mesmas apresentam pequenas variações na sua massa molecular ou na sua carga (Veloso et al., 2002).

Para separar as proteínas habitualmente presentes numa matriz queijo é frequente utilizarem-se géis de poliacrilamida (Delgado et al., 2010a; Ordiales et al., 2013b; Pino et al., 2009a; Veloso et al., 2002). Segundo o investigador Morr (1971) citado pelos autores Shalabi e Fox (1987), que fizeram uma revisão das técnicas eletroforéticas usadas para o estudo da proteólise, testou-se e analisou-se a separação das proteínas do queijo em géis de amido e de poliacrilamida. Este autor concluiu que ambos os tipos de géis permitiam uma razoável resolução na zona das α e β caseínas, sendo que a mais utilizada pelos investigadores é a técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida.

Uma vantagem do uso da eletroforese para a separação proteica é permitir a extração das proteínas do gel, digerir e identifica-las por espectrometria de massa, dando uma informação mais detalhada sobre as proteínas e péptidos envolvidos na maturação do queijo.

2.4.1.1. Ureia-PAGE

O método de ureia-PAGE separa as frações proteicas pela diferença que as diferentes proteínas apresentam em termos de carga elétrica que têm ao pH do gel de poliacrilamida (Egito et al., 2006).

Os géis de poliacrilamida com ureia, têm sido os mais utilizados no estudo e análise dos perfis proteicos do queijo, sendo que a sua concentração em ureia varia bastante, consoante os diferentes estudos. A sua utilização destina-se fundamentalmente à separação das diferentes frações das proteínas presentes no extrato insolúvel a pH de 4,6, ou seja, as caseínas. Alguns autores também testaram métodos de eletroforese em gel de poliacrilamida com diferentes concentrações em ureia, para a separação das proteínas presentes na fração solúvel a pH 4,6, tendo sido possível a separação das proteínas desta fração, mas não a sua identificação (Shalabi & Fox, 1987b). Os autores Sousa *et al.* (2001) fazem uma revisão sobre as técnicas usadas no estudo da proteólise durante a maturação do queijo, apontando para o uso da eletroforese em gel de poliacrilamida com ureia para comparar o efeito de diferentes agentes coagulantes na proteólise primária, analisando a fração insolúvel (pH=4,6). Esta técnica pode ser complementada com sequenciação e identificação dos produtos que resultam da proteólise primária.

Muitos investigadores têm usado esta técnica eletroforética para estudar a influência do agente coagulante na proteólise dos queijos (Fernández-Salguero & Sanjuán, 1999; O'Mahony, Sousa, & McSweeney, 2003; Ordiales et al., 2013b; Pino et al., 2009a; Tavaría, Sousa, & Malcata, 1997; Veloso et al., 2002).

Quando a técnica de ureia-PAGE é comparada com a técnica de SDS-PAGE, os mesmos autores Shalabi e Fox (1987) sugerem que a primeira é mais recomendada para a análise da fração de caseínas do queijo, uma vez que estas proteínas apresentam massas moleculares semelhantes, dificultando a separação em gel de poliacrilamida com a adição de SDS. Igualmente, o autor Sousa *et al.* (2001), sugere o uso das técnicas eletroforéticas em gel de poliacrilamida com ureia, para separação das proteínas presentes na fração insolúvel em água (pH=4,6) do queijo, para comparar o efeito de diferentes agentes coagulante na proteólise primária.

Num estudo realizado pelos autores O'Mahony *et al.* (2003) com o objetivo de avaliação da proteólise no queijo Cheddar, a técnica de ureia-PAGE permitiu observar as frações de caseínas de maiores dimensões bem como observar a sua degradação ao longo da sua fase de maturação.

Os autores Sousa e Malcata (1998) identificaram, com recurso à técnica ureia-PAGE, duas bandas de elevada mobilidade eletroforética, correspondentes as frações proteicas das caseínas α_s e β e concluíram que estas são hidrolisadas pelas cardosinas, presente no agente coagulante vegetal usado no fabrico dos queijos.

O autor Veloso (2001), procurou testar a aplicabilidade da técnica de ureia-PAGE em conjunto com a técnica de RP-HPLC, para avaliar o perfil de caseínas do leite de várias espécies, bem como caseínas dos queijos de ovelha e vaca, de modo a detetar possíveis adulterações do leite usado para a produção de queijo. Os dois métodos permitiram a deteção de adulterações de leite nos queijos testados. Os perfis de caseínas, dos vários tipos de queijo, foram possíveis de observar e a separação das proteínas apresentou uma boa resolução. Através da comparação destas duas técnicas, estes autores concluíram que, para o caso da análise da existência de adulteração, foi mais eficaz usar a técnica de ureia-PAGE, quando comparada com RP-HPLC, porque a primeira técnica é mais sensível, permitindo a deteção de diferenças entre leites de diferentes espécies, com quantidades de amostra mais pequenas do que o RP-HPLC. Esta última só permitiu observar o mesmo tipo de adulterações para adições de leite de outra espécie iguais ou superiores a 5%.

Do mesmo modo, os autores Egito *et al.* (2006), realizaram um estudo com o objetivo de detetar adulterações do leite de caprino com o leite de bovino. Embora otimizadas ambas as técnicas de ureia e SDS PAGE, a mais apropriada revelou ser a primeira, uma vez que à semelhança do estudo anterior, esta permitiu uma deteção da α_s -caseína bovina a partir da adição de 2,5% de leite de vaca.

No entanto nem todos os estudos são consensuais em achar que a técnica de ureia-PAGE é a mais indicada no estudo de adulteração dos produtos lácteos. No caso do autor Mayer (2005), através de um estudo com o mesmo

objetivo, concluiu que a técnica de ureia-PAGE não é a mais adequada na detecção de leite de bovino em queijos fabricados com leite de outras espécies, que apresentem um grau de proteólise elevado, uma vez que os produtos da degradação destas caseínas apresentam uma mobilidade eletroforética semelhante à das α_s -caseínas bovinas. Deste modo, apenas é confiável o uso desta técnica em queijos onde não se observem mudanças proteolíticas, ou seja, em queijos com tempos de maturação curtos.

2.4.1.2. SDS-PAGE

A técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS, é usada para separar as proteínas segundo a sua massa molecular como revisto pelos autores Tom Berkelman e Fernando García-Carreño (2001).

Este tipo de eletroforese é realizado com recurso a um gel de poliacrilamida na presença do detergente dodecil sulfato de sódio (SDS). Este detergente aniônico liga-se às proteínas em função do número de aminoácidos das mesmas. Assim, confere carga negativa proporcional à massa molecular da proteína. Para a separação por massa molecular contribui a porosidade do gel. A regulação desta porosidade é conseguida pela concentração deste em poliacrilamida, uma vez que o gel apresenta na sua constituição ligações de N, N-metil-bis-acrilamida. Deste modo, a porosidade do gel é inversamente proporcional à sua concentração em poliacrilamida. Ou seja, quanto menor a concentração do gel em poliacrilamida, maior a malha do gel, e consequentemente maior a sua porosidade (Rocha et al., 2005).

O SDS, para além de conferir carga negativa, tem a capacidade de desnaturar as proteínas, tornando as suas cadeias, inicialmente com uma estrutura globular, em cadeias lineares, simplificando a sua forma (Rocha et al., 2005).

A técnica de SDS-PAGE foi utilizada pelos investigadores Ordiales *et al.* (2013), com o objetivo de complementar a avaliação da influência de agentes coagulantes vegetais, extraídos a partir de várias plantas de *Cynara cardunculus*, na atividade coagulante e proteolítica nas caseínas do queijo “*Torta del Casar*”. Esta técnica foi usada na análise do soro dos vários tipos de queijo

produzidos em três fases distintas da sua maturação: 2, 30 e 60 dias de cura. Foi possível observar os produtos que resultam da hidrólise das frações de caseínas, bem como outras frações proteicas existentes no soro do queijo. Esta técnica foi utilizada de modo a complementar a técnica de ureia-PAGE, a qual separou as proteínas da fração de caseínas, de modo a compreender, que produtos resultam da degradação desta fração.

Embora esta técnica seja muito utilizada para a separação proteica de muitas macromoléculas, a eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS, não é das mais eficazes na separação das proteínas pertencentes à fração insolúvel a pH 4,6, do queijo, como apresentado no artigo de revisão dos autores Shalabi e Fox (1987). Isto porque as massas moleculares das diferentes isoformas de caseínas apresentam-se muito semelhantes, não permitindo a sua separação por este método. Ainda assim, é comum usar-se esta técnica como segunda dimensão da técnica de eletroforese bidimensional.

2.4.1.3. Eletroforese Bidimensional

Em 1975, a técnica de eletroforese bidimensional, foi desenvolvida pelos investigadores O'Farrel e Klose. Esta técnica consiste, como o nome indica, numa separação em duas dimensões, sendo a primeira uma separação através da carga nativa da proteína (focagem isoelétrica) e a segunda uma separação por massas moleculares, através de uma corrida eletroforética em gel de poliacrilamida. Quando começou a ser aplicada, esta técnica usava géis cilíndricos de poliacrilamida, os quais formavam um determinado gradiente de pH, sendo o mesmo conseguido através de uma corrida inicial com moléculas anfotéricas específicas. Depois desta primeira separação, por pontos isoelétricos, as proteínas eram posteriormente submetidas a uma corrida eletroforética com adição de SDS (Rocha et al., 2005). Apesar do mais frequente ser a realização da segunda dimensão em géis SDS-PAGE, é possível fazê-la também em géis de ureia-PAGE. Isto acontece principalmente no caso de se pretender separar a fração de caseínas por esta técnica, uma vez que, tal como foi referido anteriormente, os géis de ureia-PAGE permitem uma melhor separação das mesmas.

Como revisto pelos autores Chin e Rosenberg (1998), e referido ao longo desta revisão bibliográfica, as técnicas de avaliação da proteólise dos queijos mais utilizadas são as técnicas de eletroforese unidimensional, mais concretamente ureia-PAGE e SDS-PAGE. No entanto a técnica de eletroforese bidimensional surge como uma resposta às limitações da eletroforese unidimensional, permitindo uma maior separação e avaliação da fração proteica solúvel, principalmente a nível de proteínas que tenham massas moleculares semelhantes, mas cargas diferentes. Deste modo, a técnica de eletroforese bidimensional apresenta uma maior resolução.

Os autores Chin e Rosenberg (1998) usaram a eletroforese bidimensional, para separação das proteínas da fração solúvel a pH 4,6, em que a segunda dimensão foi feita em gel de poliacrilamida com ureia, para monitorizar a proteólise durante a maturação (180 dias) do queijo Cheddar. Compararam queijos com elevado e reduzido teor de gordura, bem como o tempo de maturação. Concluíram que este método permitiu quantificar as variações dos níveis de péptidos e foi eficaz na separação, em *spots* individuais, dos produtos heterogéneos resultantes da proteólise das principais proteínas. A alteração no perfil proteico bidimensional da fração solúvel refletiu a libertação dos produtos da proteólise primária resultantes da degradação das principais caseínas (α_s e β caseínas). A eletroforese bidimensional também se revelou eficaz na deteção dos efeitos dos diferentes fatores testados (tempo de maturação e teor em gordura dos queijos). Os autores concluíram que a técnica unidimensional em gel de poliacrilamida com ureia e a técnica de eletroforese bidimensional complementam-se entre si no estudo da proteólise dos queijos, pela avaliação de ambas as frações proteicas do queijo (solúvel e insolúvel).

Apesar destas vantagens, esta técnica tem sido pouco utilizada na avaliação das frações proteicas do queijo. Um dos motivos é a morosidade da técnica e a quantidade de amostra exigida pela mesma, o que pode ser limitante em alguns estudos.

2.4.1.4. Eletroforese capilar

A eletroforese capilar é uma ferramenta de separação usada em moléculas pequenas e simples, orgânicas, bem como moléculas volumosas e complexas como proteínas e ácidos nucleicos. Esta técnica surge pela sua elevada versatilidade, bem como pela sua eficiência. Deste modo torna-se uma ferramenta usada em várias áreas do conhecimento (Spudeit, Dolzan, & Micke, 2012). Esta técnica de eletroforese capilar efetua a separação em capilares e baseia-se nas diferenças entre as mobilidades de espécies carregadas, num meio com eletrólitos que podem ser aquosos ou orgânicos (Silval, Coltro, Carrilho, & Tavares, 2007).

De entre os vários tipos de eletroforese capilar, existe esta técnica aplicada em gel (CGE), à semelhança das restantes técnicas de eletroforese descritas anteriormente. A vantagem desta técnica relativamente à eletroforese clássica em gel prende-se com a obtenção de resultados quantitativos mais exatos, tempos de análise mais curtos e uma maior automação do processo (Spudeit et al., 2012).

Segundo Cancalon (1995) e Manabe (1999) citados por Ordiales et al. (2012), a eletroforese capilar apresenta vantagens de utilização relativamente ao SDS-PAGE, sendo a primeira técnica de mais rápida análise e deteção e tendo uma aumentada eficiência e resolução. Esta técnica consiste numa simples extração de proteínas, bem como o uso de uma pequena quantidade de solventes orgânicos, quando comparado com outras técnicas como o RP-HPLC. Assim, permite uma análise eficiente na separação de proteínas alimentares, como as proteínas do leite. Os investigadores Otte, Ärdo, Weimer e Sorensen (1999) bem como Cattaneo, Nigro, Toppino e Denti (1996), usaram esta técnica na avaliação da proteólise do queijo de bovino e de ovino, respetivamente (revisto por Ordiales et al., 2012).

A eletroforese capilar é uma técnica que tem sido usada como alternativa a outros métodos de avaliação da qualidade do agente coagulante para a produção de queijo, sendo que os autores Ordiales *et al.* (2012) sugerem o seu uso de forma rotineira para o controlo de qualidade do agente coagulante vegetal

usado no fabrico do queijo “*Torta del Casar*” para atribuição da Designação de Origem Protegida.

A técnica de eletroforese capilar foi usada para estudar a evolução das caseínas ao longo do processo de maturação do queijo Roncal bem como para avaliar o tipo de agente coagulante usado (Irigoyen, Izco, Ibáñez, & Torre, 2000). A quantificação das α_s e β caseínas foram feitas em seis fases de cura distintas (1, 15, 30, 60, 120 e 180 dias de cura). Através da utilização desta técnica, observou-se que a β -caseína sofreu uma menor degradação, em comparação com a α_s -caseína, sendo esta ultima fortemente influenciada pela atividade coagulante do agente coagulante, deste modo quanto maior essa atividade, maior a degradação desta fração. A eletroforese capilar relevou ser uma técnica de sucesso tendo em conta os objetivos desta investigação (Irigoyen et al., 2000).

Os autores Spudeit *et al.* (2012), que fazem uma revisão dos diferentes tipos de técnicas de eletroforese capilar, sugerem o uso desta técnica para a separação proteica uma vez que apresenta um menor custo operacional, uma maior versatilidade de análises, maior simplicidade instrumental, reduzido tempo, quantidades e toxicidade de reagentes e resíduos, quando comparados a técnicas de HPLC. No entanto, esta técnica ainda carece de investigação e aplicabilidade nas diversas áreas científicas, de modo a melhorar a sensibilidade e reprodutibilidade das análises.

3. Metodologia

3.1. 1º Ensaio - Otimização da metodologia para análise do perfil proteico.

3.1.1. Recolha e preparação de amostras

Neste ensaio, com vista à otimização, foram usados 5 queijos de Évora com 24 horas, 6, 8 e 30 dias de maturação, perfazendo um total de 20 queijos. Estes queijos foram produzidos na queijaria Cachopas em Évora, segundo o método tradicional de fabrico do queijo de Évora.

No laboratório, realizaram-se várias medições nos queijos antes de estes serem partidos e as amostras preparadas. Foi medido o seu peso, a sua altura e diâmetro, bem como o pH em três pontos distintos do queijo, embora os resultados destas medições não sejam analisados neste estudo.

Para a preparação das amostras, foi removida a casca dos queijos, na sua totalidade. Uma porção de cerca de um quarto de queijo, foi grosseiramente triturado e armazenado em tubos de Falcon. O restante foi conservado em película aderentes e em sacos de congelação, devidamente identificados. Todas as amostras, foram conservadas e mantidas a -25°C.

3.1.2. Método de extração das caseínas do queijo

As caseínas foram obtidas através de precipitação ácida com acetato de amónio, de acordo com o protocolo descrito por Ordiales *et al.* (2013). O protocolo em causa foi otimizado com vista à determinação da quantidade ideal de queijo e volume de solução de acetato de amónio 1M. Foram testadas quatro quantidades diferentes de amostra, de quatro fases de cura (24 horas, 6, 8 e 30 dias) distintas: 0,25g, 0,50g, 0,75g e 1,00g, perfazendo um total de 20 amostras

O procedimento experimental iniciou-se com a adição dos diferentes volumes da solução tampão de acetato de amônio 1M, pH 4,3, sendo a suspensão resultante colocada a 8°C durante 20 minutos. Após esse período, procedeu-se a uma centrifugação em centrífuga refrigerada (HERMLE LABORTECHNIK, HERMLE- Z323K) a 3000g, 4°C durante 15 minutos, tendo sido descartado o sobrenadante (Figura 11). Ao precipitado resultante, foi adicionado igual volume de solução tampão de acetato de amônio 1mM, pH 4,3, seguindo-se ressuspensão do mesmo com o auxílio de ultrassom (VWR-ULTRASONIC CLEANER) e nova centrifugação a 3000g, 4°C, durante 10 minutos. Posteriormente, removeu-se cuidadosamente, com o auxílio de uma espátula, a camada de gordura formada na parte superior, sendo o sobrenadante novamente desprezado. O precipitado resultante foi sujeito a nova centrifugação nas mesmas condições referidas anteriormente.



Figura 11 - - Precipitação da fração das caseínas, por centrifugação e adição de acetato de amônio.

Por fim, procedeu-se a uma lavagem com acetona a -20 °C a 90%, para retirar a gordura residual existente. Os respetivos volumes de acetona foram adicionados consoante a quantidade de queijo utilizada.

Após a adição da acetona fria, as amostras foram colocadas a -20°C, durante 20 minutos, e posteriormente centrifugadas a 22 000 g, durante 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado resultante sujeito a nova lavagem nas condições referidas anteriormente. Após a lavagem, o precipitado foi seco à temperatura ambiente e congelado até posterior utilização.

O protocolo foi realizado como descrito anteriormente, experimentando diferentes velocidades e temperaturas de centrifugação, de modo a encontrar a condições ótimas para formação do precipitado, uma vez que a matriz, apresenta elevados teores de gordura.

A otimização foi realizada com sucesso uma vez que foi possível a separação do precipitado do sobrenadante, independentemente da quantidade de amostra de queijo usada. Esta avaliação foi feita visualmente pela observação das amostras precipitadas.

3.1.3. Eletroforese em gel de poliacrilamida com ureia

A técnica eletroforese ureia-PAGE (*denaturing urea polyacrylamide gel electrophoresis*) foi otimizada a partir do protocolo realizado por Andrews (1983). Assim, para otimização da técnica, foram testadas as amostras resultantes das precipitações de 0,25, 0,50, 0,75 e 1,00g de queijo. Para a realização deste procedimento, foram preparados géis de 8 x 10 cm e 1 mm de espessura. O gel de resolução (10% acrilamida) consistiu em 5mL de acrilamida/bis-acrilamida 30% (m/v), 7,3mL de tampão do gel de resolução (Tris 0,76M; ureia 9M, pH 8,9), 2,5mL de água bidestilada, 150µL de APS (*Ammonium Persulfate*) 0,1g/mL e 50µL de TEMED (*Tetramethylethylenediamine*). Esta mistura foi então colocada nas placas de vidro, sem criar bolhas, até 1 cm abaixo do topo do vidro da frente e adicionou-se água bidestilada sobre o gel de modo a evitar o contacto da mistura com o ar. A mistura ficou a polimerizar durante cerca de 15 minutos. Passado o tempo de polimerização, foi aplicado o gel de concentração (4% acrilamida), consistindo em 800µL de acrilamida/bis-acrilamida 30%, 4,7mL de Tampão do gel de concentração (Tris 0,06M; ureia 4,5M, pH 7,6), 450µL de água destilada, 40µL de APS e 10µL de TEMED. No gel de concentração foi colocado um pente levando à formação de 10 poços para aplicação das amostras.

Após a polimerização os géis foram colocados num sistema Protean mini (Bio-Rad). As câmaras superiores e inferiores foram cheias com tampão de eléctrodo (Tris 0,02 M; glicina 0,19 M). As amostras foram misturadas na proporção de 1:2 com o tampão de amostra concentrado, de modo a ficar com uma concentração final de: Tris 0,125M pH 6,8; Ureia 8,2 M; EDTA 2,5 Mm; β-

mercaptoetanol 0,2 M; 0,01% de azul de bromofenol. Com vista a determinar o volume ideal de amostra que permita uma boa separação das caseínas presentes na matriz, foram testados os volumes de 7,50, 5,00, 2,50 e 1,25µL de amostra (obtida a partir da precipitação de 1g de queijo). Após a junção destes volumes com o respetivo tampão de amostra referido anteriormente, as mesmas foram aquecidas num banho seco, a 95°C, durante 5 minutos e colocadas em gelo até à sua aplicação nos poços do gel. Num dos poços do gel foi aplicada também uma mistura de caseínas (Casein from bovine milk, SIGMA®, C5890), como padrão.

A corrida eletroforética decorreu em tina vertical (BioRad, Mini PROTEIN® Tetra Cell), a uma amperagem inicial de 20 mA até atingir o gel de corrida e posteriormente a 40 mA, durante cerca de 2 horas e 30 minutos.

Seguidamente os géis foram corados com uma solução de 0,1% azul brilhante *Coomassie* (*Coomassie Brilliant Blue*) (CBB) R250 em 50% (v/v) metanol e 10% (v/v) ácido acético, e descorados numa solução de 10% (v/v) ácido acético, a qual foi mudada várias vezes até as bandas serem visíveis e o fundo ficar claro.

Os géis foram digitalizados através do Scanner ImageScanner III (GE healthcare) e o software LabScan, sendo que a análise dos géis foi feita através da utilização do software GelAnalyzer (<http://www.gelalyzer.com/>).

3.1.4. Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS

Para a realização da electroforese SDS-PAGE (*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) foram preparados géis de 8 x 10 cm e 1 mm de espessura. O gel de resolução (14% acrilamida) consistiu em 5mL de Tris-HCl 1.5M, pH 8.8, 200 µl de SDS, 3,3mL de acrilamida/bis-acrilamida 30% (m/v), 5,5mL de água bidestilada, 150µL de APS (*Ammonium Persulfate*) 0,1 g/mL e 10µl de TEMED. Esta mistura foi colocada nas placas de vidro, sem criar bolhas, até 1 cm abaixo do topo do vidro da frente e adicionou-se água bidestilada sobre o gel de modo a evitar o contacto da mistura com o ar. A mistura ficou a polimerizar durante cerca de 45 minutos. Passado o tempo de polimerização, foi aplicado o gel de concentração (4% acrilamida), consistindo em 2mL de Tris-HCl

0,5, pH 6.8, 80µL de SDS, 4,86mL de água bidestilada, 1,06mL de acrilamida/bis-acrilamida 30%, 48µL de APS e 8,8µL de TEMED.

Após a polimerização os géis foram colocados num sistema Protean mini (Bio-Rad). As câmaras superiores e inferiores do sistema foram cheias com tampão de corrida (0,025M Tris, 0,192M glicina, 1% (m/v) SDS). As amostras foram misturadas com tampão de amostra concentrado, de modo a ter uma concentração final de: 0,125M Tris-HCl, pH 6.8, 1% SDS (m/v), 5% 2-mercaptoetanol, 20% glicerol, quantidade vestigial de azul de bromofenol. Em seguida, foram aquecidas num banho seco, a 95°C, durante 5 minutos, e em seguida colocadas em gelo, seguindo-se a sua aplicação nos poços do gel, num volume correspondente a 7,5, 5,00 e 2,50µL da amostra obtida através de precipitação de 1g de queijo. Num dos poços de cada um dos géis foram aplicados 3 µL de um marcador de massas moleculares (Dual Color da Bio.Rad, Ref. 161-0324). As proteínas foram separadas a uma voltagem constante de 140 V. A corrida electroforética decorreu até que a frente de corrida atingiu o final do gel.

No final da corrida electroforética, os géis foram corados em solução 0,1% Coomassie Brilliant Blue G-250 em 50% (v/v) metanol e 10% (v/v) ácido acético, e descorados em água destilada a qual foi mudada várias vezes até as bandas serem visíveis e o fundo ficar claro.

Os géis foram digitalizados através do Scanner ImageScanner III (GE healthcare) e o software LabScan.

3.2. 2º Ensaio - Análise do perfil proteico do Queijo de Évora

3.2.1. Local e Fabrico do Queijo

Os queijos foram produzidos na queijaria “Cachopas”, em Évora.

O processo de fabrico, dos queijos usados neste ensaio, segue as orientações e obrigações do Queijo de Évora DOP.

Para este ensaio, foram produzidos queijos com recurso a quatro agentes coagulantes, três ecótipos de *Cynara cardunculus* L. e agente coagulante animal.

Os ecótipos escolhidos foram de três populações distintas de *Cynara cardunculus* L. , ecótipo da população da Abóboda, do Peral e Revilheira, como observado na tabela 1.

Tabela 1 - Identificação dos três ecótipos de Cynara cardunculus L. escolhidos, com a respetiva descrição, localização e código de laboratório.

Referência da População	Descrição e Localização	Código de laboratório
9-HA	Herdade da Abóbada, Serpa	<p><i>Cynara 1</i></p> 
12-HP	Herdade do Peral, Monte do Trigo	<p><i>Cynara 2</i></p> 
13-HR	Herdade da Revilheira, Reguengos	<p><i>Cynara 3</i></p> 

O extrato aquoso vegetal foi preparado, adicionando 18g de pistilos de cada ecótipo de *Cynara cardunculus* L. e água, adicionando o mesmo a 100 L de leite. Este preparado foi deixado repousar até ao dia seguinte, sendo posteriormente triturado, e escorrido com auxílio de um pano, para o efeito, de modo a usar o extrato aquoso.

O fabrico dos queijos iniciou-se no dia 7 de Março de 2017. Esta produção foi feita em duas laborações, usando os quatro agentes coagulantes, perfazendo assim um total de oito cubas. A cada cuba, foi adicionado cada um dos agentes de coagulação, havendo 2 cubas respeitantes a cada um desses agentes. O leite

utilizado em todas as cubas, tem a mesma proveniência e foi adicionado, às mesmas, a igual temperatura, 31°C.

Os queijos fabricados, foram armazenados em várias câmaras frigoríficas em condições controladas de temperatura e humidade.

Inicialmente os queijos são colocados na câmara de refrigeração 1, durante um dia a uma temperatura de 8°C e posteriormente movidos para uma câmara, onde permaneceram 2 dias, em condições de temperatura e humidade relativa de 7°C e 90-92%. Passaram ainda para mais três câmaras, novamente com condições de temperatura e humidade relativa específicas, como se observa na tabela 2.

Tabela 2 - Condições de temperatura (°C) e humidade relativa (%), das câmaras de refrigeração onde foram colocados os queijos ao longo do tempo de maturação.

Câmara de Refrigeração	1	2	3	4	5
Tempo de permanência na câmara (dias)	0 – 1	1 – 3	3 – 7	7 – 14	14 - 63
Temperatura (°C)	8	7	8-9	10	14 - 14,5
Humidade relativa (%)		90 - 92	85	76	67

3.2.2. Recolha e preparação de amostras

Para este ensaio, as amostras foram recolhidas em três fases de cura distintas, às 24h, aos 35 e 60 dias de maturação.

Em cada dia foram recolhidos dez queijos de cada cuba, sendo posteriormente feitas duas pools, representativas de cada cuba, constituídas por cinco queijos cada.

As amostras foram recolhidas em tubos de Falcon de 50mL. Em cada tubo, foram recolhidos aproximadamente 20 g de cada pool de queijos. Perfazendo um total de 16 amostras por fase de cura (4 agentes coagulantes X

2 cubas por agente coagulante X 2 *pools* por cada cuba), como pode ser esquematizado na tabela 3.

No laboratório foram preparadas alíquotas de 1g de amostra por cada pool em tubos de Falcon de 15 mL.

Estes foram, posteriormente, conservados a -25°C, numa câmara frigorífica.

Tabela 3 - Tabela representativa da recolha das amostras na queijaria e no laboratório

Queijaria	Agentes Coagulantes	Cynara 1		Cynara 2		Cynara 3		Animal	
	Cubas	C1	C5	C2	C6	C3	C7	C4	C8
	Amostras (Queijos)	10	10	10	10	10	10	10	10
Laboratório	Pools	5+5	5+5	5+5	5+5	5+5	5+5	5+5	5+5
	Dias de Cura	24Horas	24Horas	24Horas	24Horas	24Horas	24Horas	24Horas	24Horas
		35 Dias	35 Dias	35 Dias	35 Dias	35 Dias	35 Dias	35 Dias	35 Dias
		63Dias	63Dias	63Dias	63Dias	63Dias	63Dias	63Dias	63Dias
	Total Amostras	6	6	6	6	6	6	6	6

48

3.2.3. Análise eletroforética das caseínas do queijo de Évora.

3.2.3.1. Método de extração das caseínas.

Tendo em conta os resultados obtidos, na comparação entre métodos de separação Ureia-PAGE e SDS-PAGE, a análise da evolução do perfil de caseínas ao longo do processo de cura foi feito, usando a técnica de ureia-PAGE. Para a extração das caseínas, foi usado uma quantidade de amostra de 1g das várias fases de cura (24 horas, 35 e 60 dias). Este protocolo de extração das caseínas, foi realizado com descrito anteriormente no ponto 1.1.2. o qual foi otimizado tendo em conta a matriz, Queijo de Évora.

Tendo em conta o processo de otimização, as condições usadas corresponderam a velocidade e temperatura de centrifugação de 6000g e 2°C durante 10 minutos.

3.2.3.2. Eletroforese Ureia-PAGE

A técnica eletroforética Ureia-PAGE, foi realizada com as amostras precipitadas com 1 g de amostra, ressuspensas em 6 mL de água destilada, tendo em conta a otimização da técnica eletroforética Ureia-PAGE, descrita no ponto 3.1.3.

Os géis foram digitalizados através do Scanner ImageScanner III (GE healthcare) e o software LabScan, sendo que a análise dos géis foi feita através da utilização do software GelAnalyzer (GE healthcare).

3.2.4. Separação das proteínas da fração proteica solúvel do queijo de Évora por eletroforese bidimensional

3.2.4.1. Método de extração da fração proteica solúvel

O protocolo de extração da fração proteica foi realizado e otimizado com base no procedimento descrito por Ordiales (2013).

Para a extração das proteínas solúveis foram pesados 10 g de amostra (“pool de queijos”) e adicionado um volume de 30 mL de água destilada e homogeneizados, com recurso a um homogeneizador (Ultra-Torrax T25, IKA® - Labortechnik), em períodos de tempo curtos, de modo a controlar a temperatura, evitando desnaturação das proteínas.

Seguidamente as amostras foram colocadas em tubos de Falcon de 50 mL, e centrifugadas a uma velocidade de 6000g, a temperatura de 4°C, durante 15 minutos.

O sobrenadante foi guardado e o precipitado descartado (Figura 12).

Tendo em conta que através deste processo podem existir ainda algumas caseínas no sobrenadante, acertou-se o pH da solução a 4,6, com ácido clorídrico (HCl) e/ou com hidróxido de sódio (NaOH), de modo a precipitar a totalidade das caseínas ao seu ponto isoelétrico. As amostras foram posteriormente centrifugadas a uma velocidade de 2500g, a uma temperatura de 4°C, durante 10 minutos.



Figura 12 - Extração e separação da fração do soro.

3.2.4.2. Determinação da concentração proteica

A quantificação do total de proteína, na fração proteica solúvel foi realizada através do método de Bradford (Hammond & Kruger, 1988). Esta determinação foi feita através da utilização do reagente previamente preparado [10% (m/v) reagente *Coomassie* G-250; 5% etanol 95%; 10% ácido fosfórico 85%]. Para traçar a curva de calibração foram utilizadas concentrações de 25, 50, 75, 150 e 200 µg/mL de albumina de soro bovino (BSA- **Bovine Serum Albumin**). As amostras de soro foram descongeladas, em gelo, diluídas 20X, 30X, 100X, 200X, 300X, 350X, 400X, 450X, com água destilada. Foram aplicados 10 µL de cada solução de BSA e o mesmo volume de cada amostra, em triplicados em diferentes poços da microplaca (placa de 96 poços). Posteriormente, adicionaram-se 200 µL do reagente de Bradford. Após incubação à temperatura ambiente, durante 1-2 minutos, foram feitas as leituras de absorvância a um comprimento de onda de 600 nm, num leitor de microplacas (Glomax, Promega). Para cada placa, traçou-se uma reta de calibração com os valores médios das absorvâncias de cada padrão de BSA em função da quantidade de proteína. Por interpolação, e tendo em conta o fator de diluição, calculou-se a concentração de proteína total para cada um dos triplicados das amostras.

3.2.4.2.1. Eletroforese Bidimensional

O procedimento experimental consistiu numa primeira fase em concentrar as amostras da fração proteica solúvel através da precipitação com TCA 20%. Para isso, ao volume de amostra correspondente à quantidade de proteína desejada (200µg) adicionou-se um volume três vezes superior de uma solução de TCA20%. Esta mistura foi agitada em *vortex* e incubada a -20°C de um dia para o outro. Em seguida, foi feita uma centrifugação, a 4°C e a uma rotação de 27000 g, durante 30 minutos. O precipitado foi recuperado e ressuspendido em 200 µL de acetona fria, para lavagem. Esta mistura foi incubada a -20°C, durante 20 minutos e centrifugada a 4°C, 27000 g, durante 5 minutos. Este procedimento foi repetido mais uma vez, após a qual o precipitado foi recuperado e seco. Este precipitado foi misturado com 125µL de tampão de solubilização [7M ureia, 2M Tiourea], 4% (v/v) mistura de anfólitos (IPG Buffer, GE healthcare), 40mM ditioneitol (DTT)] e NaOH (0,1M). Procedeu-se a uma incubação, à temperatura ambiente, durante 1h, seguida de centrifugação durante 5 minutos a uma velocidade de 9391 g. O sobrenadante de cada amostra foi recolhido e aplicado numa das ranhuras do suporte para tiras, do sistema Multiphor II (GE healthcare). Foram usadas tiras de gel comercial com gradiente de pH 3-11 NL de 7 cm (IPG strips, GE healthcare). As tiras foram colocadas em contacto com a amostra, ficando em reidratação passiva durante a noite, à temperatura ambiente e cobertas com óleo mineral (Dry strip cover fluid, GE healthcare).

Após reidratação, as tiras foram colocadas no sistema Multiphor II, para focagem isoeletrica das proteínas (1º dimensão), seguindo as instruções do fabricante. A focagem ocorreu a uma temperatura constante de 18°C, de acordo com o seguinte programa: passo1 – subida para 100V (0:01h); passo2 – 300V (1:00h); passo3 – subida para 3500V (4:00h); passo4 – 3500V (4:00h).

Após focagem isoeletrica as proteínas foram separadas numa segunda dimensão, em gel de SDS-PAGE, de acordo com as suas massas moleculares. Cada tira foi sujeita a dois passos de equilíbrio de 15 minutos cada. A solução de equilíbrio consistiu em 6M ureia, 75mM Tris-HCl, pH 8.8, 29.3% (v/v) glicerol, 2% (m/v) SDS e 0.002% (m/v) de azul de bromofenol. Para o primeiro passo (de redução) foi adicionado, a esta solução, DTT, numa concentração final de 1%

(m/v) e para o segundo passo (de alquilação) foi adicionada iodoacetamida, numa concentração final de 2.5% (m/v).

Após os dois passos de equilíbrio, cada tira foi lavada com tampão de corrida (composição descrita no ponto 3.1.4) e colocada no topo de um gel de 14% de acrilamida (7X10cm) (*Mini Protein System, Bio-Rad*). A tira foi imobilizada no gel de segunda dimensão pela adição de uma solução 0.5% (m/v) de agarose.

A corrida eletroforética decorreu numa tina vertical (BIO-RAD, Mini PROTEAN®Tetra Cell), a uma voltagem constante de 140V, até a frente de corrida atingir o fim do gel. Seguidamente os géis foram colocados, numa solução de fixação (10% ácido acético, 40% metanol) durante duas horas, sendo de seguida corados com uma solução de azul brilhante *Coomassie* (*Coomassie Brilliant Blue*) (CBB) G – 250, durante uma hora e trinta minutos, e descorados em várias mudanças de água destilada.

Este procedimento pode ser esquematizado, como sugerido na figura 13.

Os géis foram digitalizados no Scanner ImageScanner III (GE healthcare) e o software LabScan e a análise dos géis bidimensionais feita através da utilização do software ImageMaster Platinum v.7 (GE healthcare). Para a análise dos géis, foi feita a deteção automática de *spots*, tendo a mesma sido corrigida, com a edição manual dos *spots* que não foram corretamente assinalados, a adição de *spots* não assinalados e a eliminação de artefactos assinalados como *spots*. Posteriormente fez-se a correspondência (*match*) de *spots* entre os diferentes géis em comparação.

O cálculo das massas moleculares aparentes foi feito, a partir dos géis, através do conhecimento das massas moleculares das proteínas presentes no padrão utilizado.

O 2D permite a visualização e comparação, não só de diferentes proteínas, mas também de diferentes isoformas da mesma proteína.

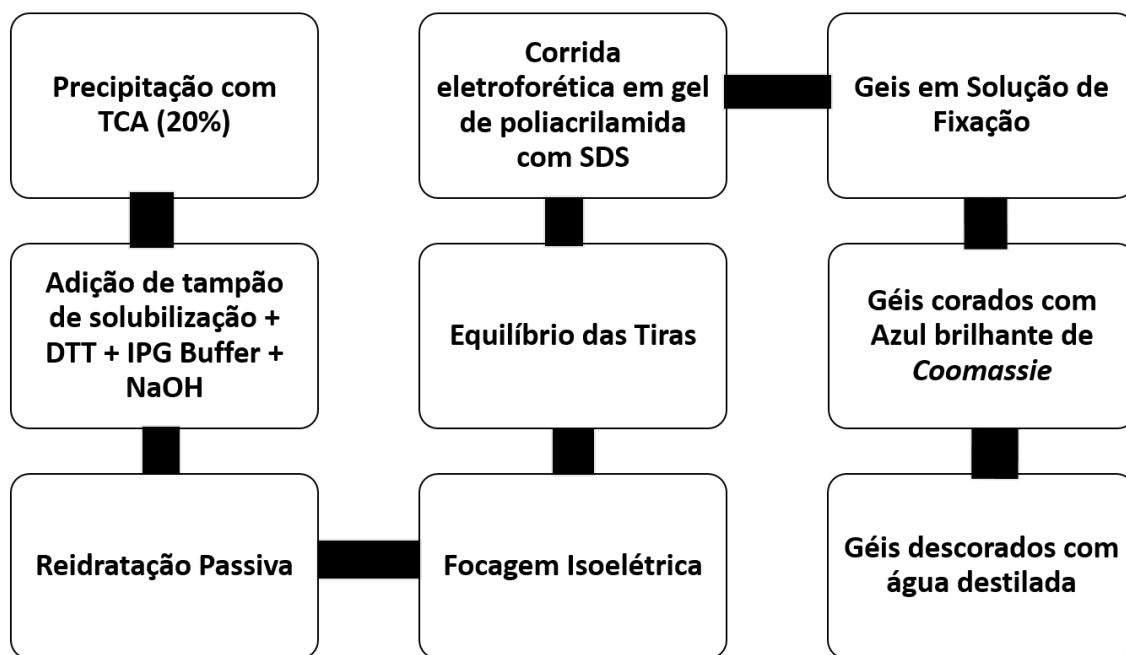


Figura 13 - Esquema representativo do protocolo de eletroforese bidimensional usado para a separação da fração proteica presente na fração proteica solúvel.

3.3. Análise Estatística

Para todos os tratamentos estatísticos, inicialmente foram testadas a normalidade (teste Shapiro-Wilk) e homocedasticidade (teste Levene) de todos os dados.

Os dados referentes às bandas dos géis de Ureia-PAGE não apresentaram distribuição normal. Deste modo, foi necessário recorrer a testes não paramétricos para análise estatística dos mesmos. Estes testes foram realizados, inicialmente, comparando os dados dos géis, das amostras de queijo produzidas com agentes coagulantes vegetais e com agente coagulante animal, bem como apenas comparados os três ecótipos de cardo, de modo a verificar se existem diferenças significativas entre as diferentes amostras.

Seguidamente, foram usados igualmente testes não paramétricos, fixando um fator, como cada dia de cura, e cada agente coagulante, de modo a estudar a evolução dos agentes coagulantes ao longo dos dias de cura, e avaliar as diferenças significativas entre os agentes coagulantes em cada dia de cura.

Os mesmos tipos de análises foram realizados para os géis de eletroforese bidimensional. Foram também avaliados todos os géis das amostras produzidas com os três ecótipos de cardo de modo a comparar a evolução do perfil da fração proteica solúvel do Queijo de Évora, ao longo das fases de maturação e também comparadas as concentrações das amostras de soro ao longo das fases de maturação.

Nas análises em que se fixa um dia de cura ou um agente coagulante foram realizadas análises de variâncias (one-way ANOVA). Para avaliar e comparar os agentes coagulantes vegetais e animal, comparar a evolução da fração proteica solúvel entre os três ecótipos de *Cynara cardunculus* L., e para comparar as concentrações das amostras de soro ao longo das fases de maturação, foi usada a análise de variância com dois fatores (two-way ANOVA).

Nestes testes estatísticos as diferenças foram consideradas para um intervalo de confiança de 95%. O software usado para efetuar a análise estatística foi o SPSS (v.24).

4. Resultados

4.1. Otimização da técnica de extração e separação das caseínas

Partindo do protocolo de extração das caseínas, referido no ponto 1.1.2 dos materiais e métodos, e de acordo com o primeiro objetivo, pelo que passarei a apresentar os resultados obtidos para o processo de otimização, e onde foram avaliados os seguintes parâmetros: (1) quantidade de queijo que permite uma melhor separação das frações proteicas insolúvel e solúvel (precipitado e sobrenadante); (2) temperatura de centrifugação; (3) velocidade de centrifugação; (4) volume de amostra de queijo que permite uma melhor separação por eletroforese. De acordo com o procedimento de otimização foi estabelecido um protocolo para a extração e separação das frações de caseínas.

Após a utilização de quantidades de amostra de 0,25g, 0,50g, 0,75g e 1,00g, para queijos com 24 horas, 6 e 8 dias de cura, verificou-se que foi possível separar o precipitado do sobrenadante, para qualquer uma das referidas quantidades.

Tendo em conta a matriz em estudo, Queijo de Évora, e o facto de esta apresentar especificidades próprias relativamente a outros tipos de queijo, nomeadamente pelo elevado teor de gordura, a técnica de extração das caseínas, foi otimizada. De acordo com as temperaturas e velocidades de centrifugação testadas, as condições que permitiram uma maior separação das caseínas das restantes frações do queijo foram a temperatura de 2°C e velocidade de centrifugação de 6000g.

Com estes parâmetros conseguiu-se separar a gordura, relativamente aos outros componentes do queijo, o que não estava a ser possível com temperaturas de 4°C, e velocidade de centrifugação de 3000g.

Para análise e estudo do perfil de caseínas dos diferentes queijos, foram comparadas duas técnicas de separação proteica: eletroforese em gel de poliacrilamida, em condições desnaturantes (SDS-PAGE) e Ureia-PAGE.

Inicialmente usando a técnica de separação eletroforética em gel de poliacrilamida com ureia (Figura 14), foram aplicadas no gel as diferentes quantidades de amostra precipitadas. Pela avaliação visual do gel e tendo em conta que para todas as quantidades de amostra de queijo precipitadas, a

separação entre precipitado e sobrenadante foi possível, foi escolhida a quantidade de amostra de 1,0 g.

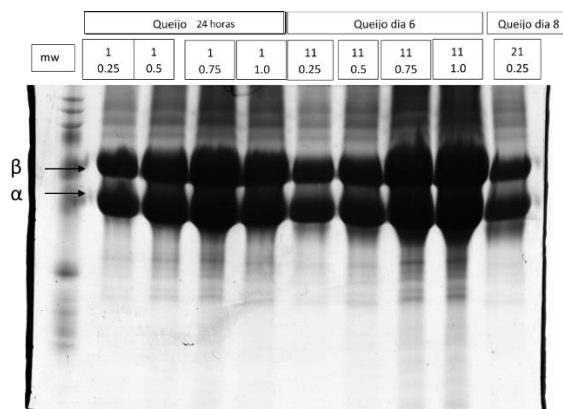


Figura 14 - Perfil de caseínas em gel de poliacrilamida com ureia, testando diferentes quantidades de amostra precipitada. Mw – marcador de massas das caseínas; 0,25, 0,50, 0,75 e 1,00 g são as quantidades de amostra aplicadas em cada poço; (1) – Amostras com 24 horas; (11) Amostras com 6 dias; (21) Amostras com 8 dias.

Seguidamente, e tendo em conta amostras precipitadas com 1,0 g de queijo, foram testadas em SDS-PAGE (Figura 15) vários volumes de amostra: 7,50 μ L; 5,00 μ L; 2,50 μ L, de modo a encontrar o que melhor permite a visualização e separação das caseínas. Através da observação da figura 14 não é possível uma grande separação das diferentes proteínas presentes na fração insolúvel dos queijos (fração de caseínas). Principalmente a nível das α_s e β caseínas (cuja presença é esperada na zona de massas moleculares acima dos 26 kDa), as quais estão presentes em quantidades elevadas e que, devido à proximidade das suas massas moleculares, são difíceis de separar. Ainda que menos intensas também se vê uma menor separação entre as bandas de massa molecular inferior. Ainda que pouco perceptível a separação das caseínas é evidente que o volume que permite, para esta técnica, uma maior separação proteica é o menor, que neste caso é de 2,5 μ L.

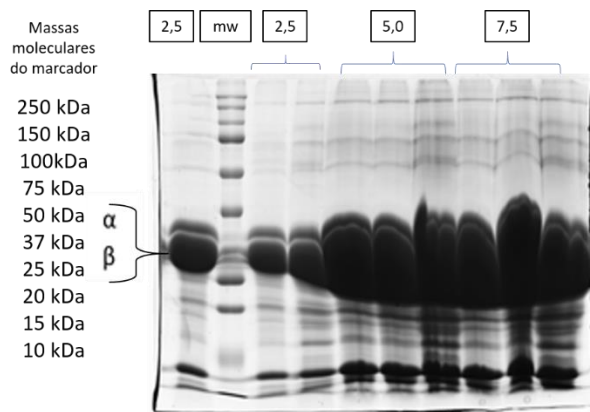


Figura 15-Perfil de caseínas em gel de poliacrilamida com SDS, testando diferentes volumes de amostra.

Seguidamente, foram testados volumes de amostra dissolvida (o precipitado foi dissolvido em 3 mL de água) de: 7,50 μ L; 5,00 μ L; 2,50 μ L e 1,25 μ L de amostra em gel de poliacrilamida com ureia. A separação de caseínas com melhor resolução foi conseguida para a quantidade de proteína presente em 1,25 μ L de extrato de caseínas, como é possível observar na figura 16.

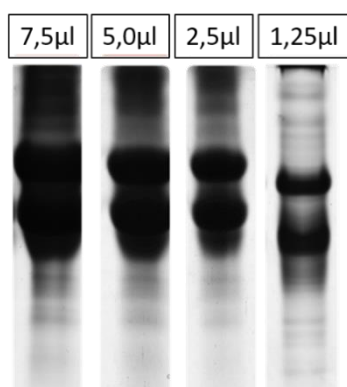


Figura 16 - Perfil de caseínas em gel de poliacrilamida com ureia, com os diferentes volumes testados de amostra, nos poços.

Pela análise visual e comparando as duas técnicas de separação eletroforética testadas, podemos concluir que tendo em conta o objetivo deste estudo, a que melhor permite uma separação das caseínas é a técnica de Ureia-PAGE.

A técnica de eletroforese Ureia-PAGE, permite uma maior separação das caseínas, uma vez que um dos parâmetros que contribui para a mobilidade eletroforética é a carga que cada uma das frações tem ao pH do gel. Na figura 15 é possível observar que se conseguem separar as frações α_s e β .

Relativamente à técnica de SDS-PAGE, embora esta não tenha permitido uma elevada separação das principais frações de caseínas, α_s e β , é uma técnica que pode ser útil na separação dos produtos da degradação destas frações, tendo em conta que no gel estes podem ser visualizados e distinguidos.

Deste modo, a técnica que iremos usar para a separação proteica da fração de caseínas do queijo é a técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida com ureia e o volume de amostra a aplicar no gel é de 1,25 μ L.

4.2. Análise do perfil eletroforético das caseínas no Queijo de Évora

24 Horas

35 Dias

63 Dias

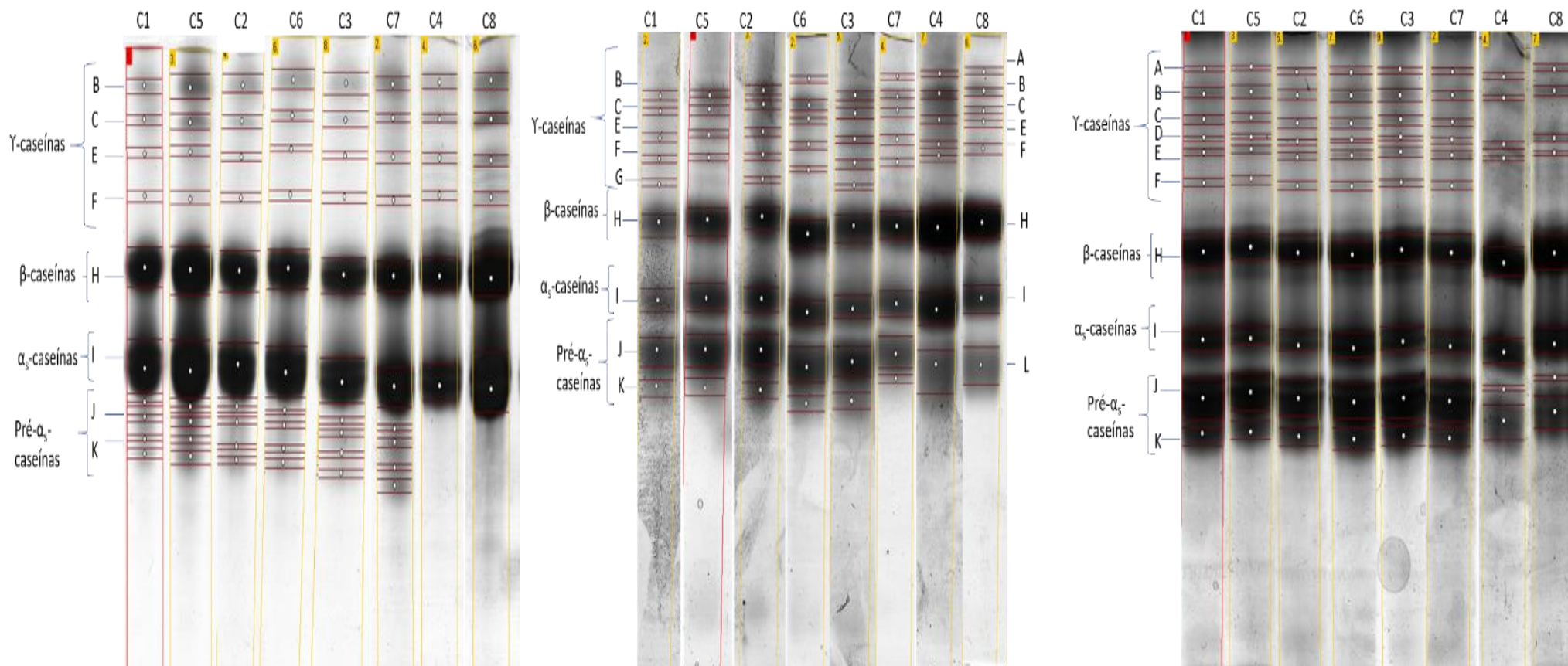


Figura 17- Perfis de caseínas dos queijos, dos três dias de cura, identificando as bandas e as respectivas cubas. C1 e C5- Cynara 1, C2 e C6 – Cynara 2, C3 e C7 – Cynara 3 e C4 e C8 – Coagulante animal.

Após a otimização do método de ureia-PAGE, este foi utilizado para comparar os perfis de caseínas entre queijos elaborados com três diferentes agentes coagulantes vegetais (três ecótipos de *Cynara cardunculus* L.) e um agente coagulante animal. Pode observar-se na Figura 17, exemplos de perfis de ureia-PAGE, representativo destes queijos, constituídos, em média por 10 bandas proteicas (A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K e L).

A partir destes perfis eletroforéticos, foram determinadas as percentagens de volume de cada banda, tendo por base as suas áreas e intensidade. De acordo com a Delgado *et al.* (2010), Fernández-Salguero e Sanjuán (1999), Pino *et al.* (2009) e Veloso *et al.* (2002) as diferentes frações de caseínas têm correspondência com as bandas observadas da seguinte forma: A, B, C, D, E, F e G correspondem à fração das γ -caseínas e as bandas identificadas no gel com as letras H, I e L, correspondem à β -caseína, α_s -caseína e pré- α_s -caseínas, respetivamente.

Tendo em conta que para que um queijo seja denominado como Queijo de Évora é necessário que o coagulante utilizado na sua produção seja um coagulante de origem vegetal, os queijos elaborados com os diferentes ecótipos de *Cynara cardunculus* L. foram considerados em conjunto e comparados com os queijos elaborados com coagulante de origem animal. Observam-se diferenças significativas (valor $p < 0.05$), entre os queijos fabricados com agentes coagulantes vegetal e os queijos em que se utilizou o agente coagulante controlo (animal), nas bandas D, E, F (γ -caseínas), H (β -caseína) e I (α_s -caseína), (Figura 18). Para qualquer uma das bandas proteicas referidas, observam-se níveis de expressão proteica mais baixos no caso dos queijos preparados a partir dos agentes coagulantes vegetais, ou seja, maior degradação proteica, como está ilustrado na figura 18.

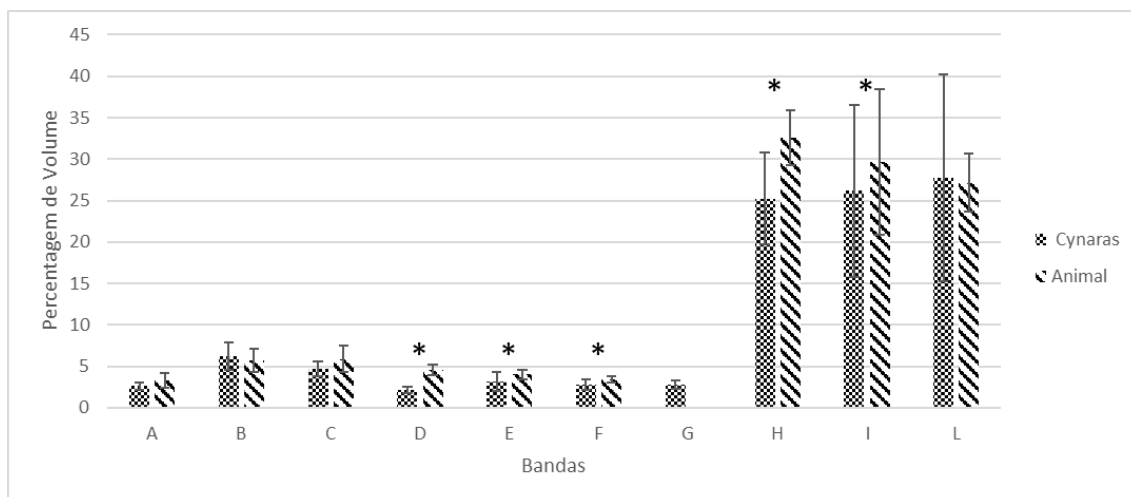


Figura 18 - Percentagem de volume das diferentes bandas, observadas nos perfis proteicos (ureia-PAGE), nos queijos fabricados com agente coagulante animal e vegetal, considerando todas as fases de cura em conjunto. Valores de média +/- desvio padrão. * significativo para $P<0,05$.

De acordo com a análise estatística, não se observam diferenças significativas

(valor $p<0.05$) entre os ecótipos de *Cynara cardunculus* L, considerando todas as fases de cura em conjunto (Figura 19).

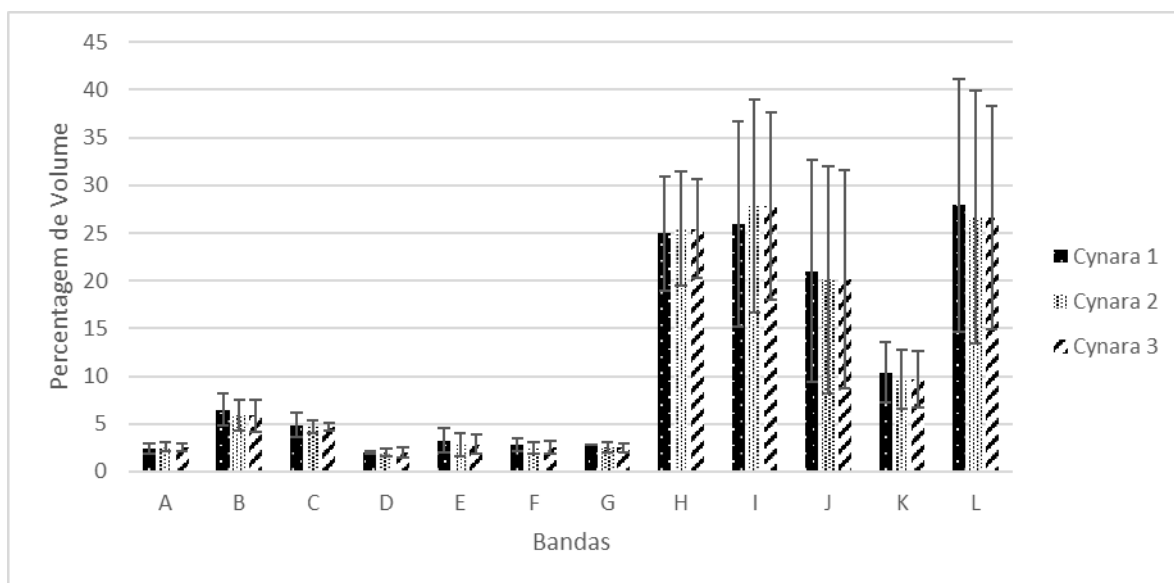
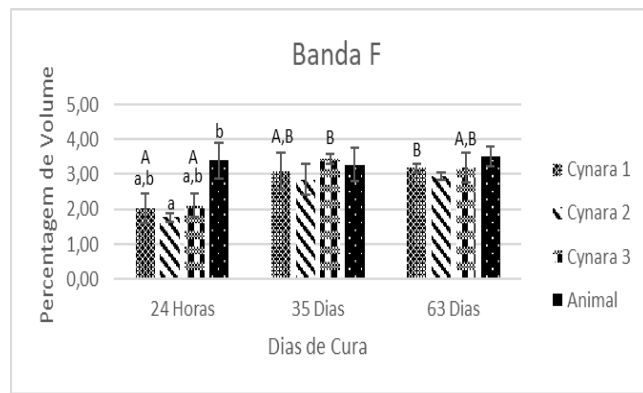
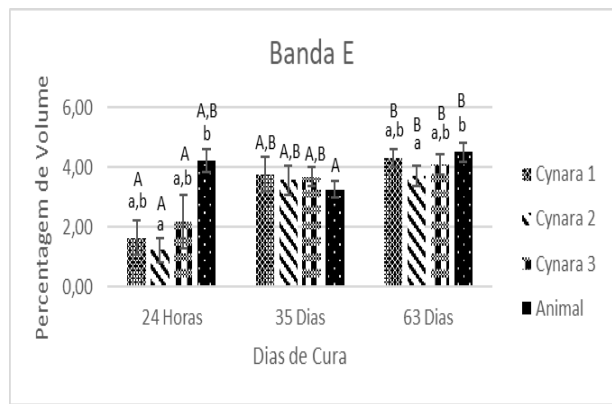
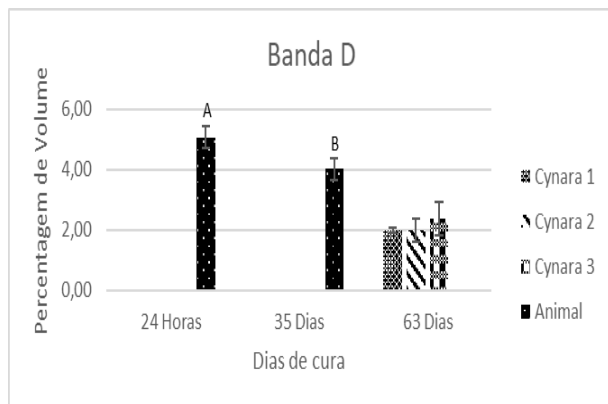
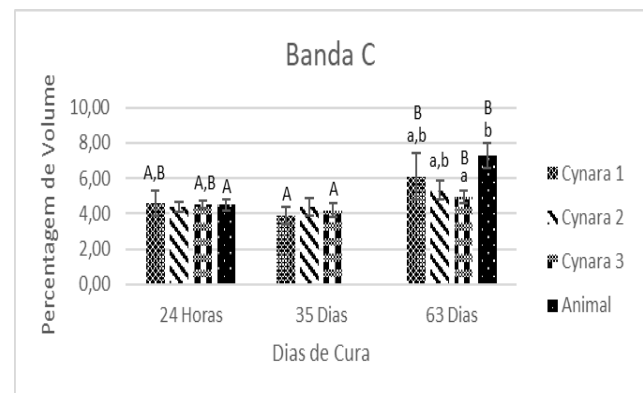
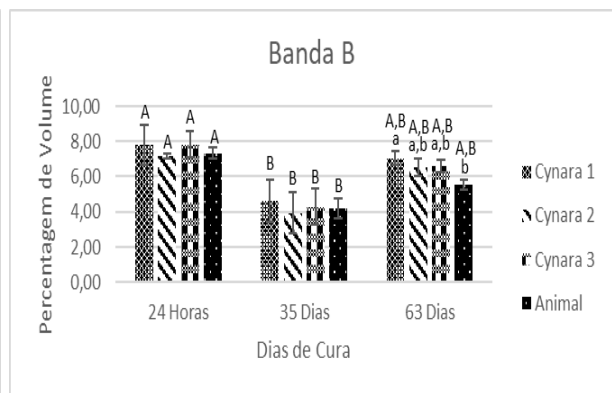
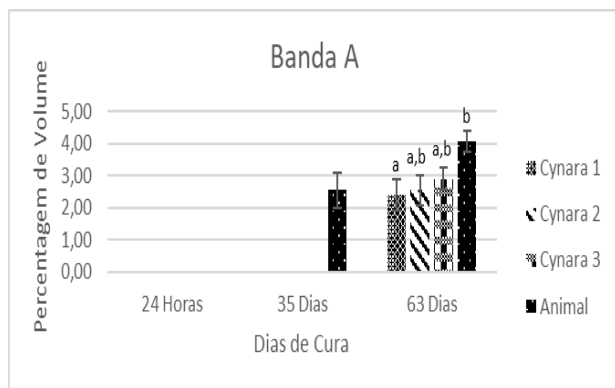


Figura 19 - Percentagem de volume das bandas, observadas nos perfis proteicos (ureia-PAGE), nos queijos fabricados com os vários ecótipos de cardo em estudo, considerando todas as fases de cura em conjunto. Valores de média +/- desvio padrão. * significativo para $P<0,05$

4.2.1 Comparação do perfil de caseínas tendo em conta os agentes coagulante e os dias de cura.

Para compreender o que ocorre em termos de alterações na constituição proteica do queijo ao longo da proteólise, foram comparados os perfis proteicos dos queijos tem em conta os quatro agentes coagulantes em estudo e as três fases de cura (24 horas, 35 e 63 dias).

Na figura 20 podemos observar os resultados estatísticos desta abordagem. Ou seja, é possível observar a variação de cada banda eletroforética expressa nos géis de poliacrilamida com ureia, tendo em conta cada agente coagulante e como esta varia ao longo da maturação.



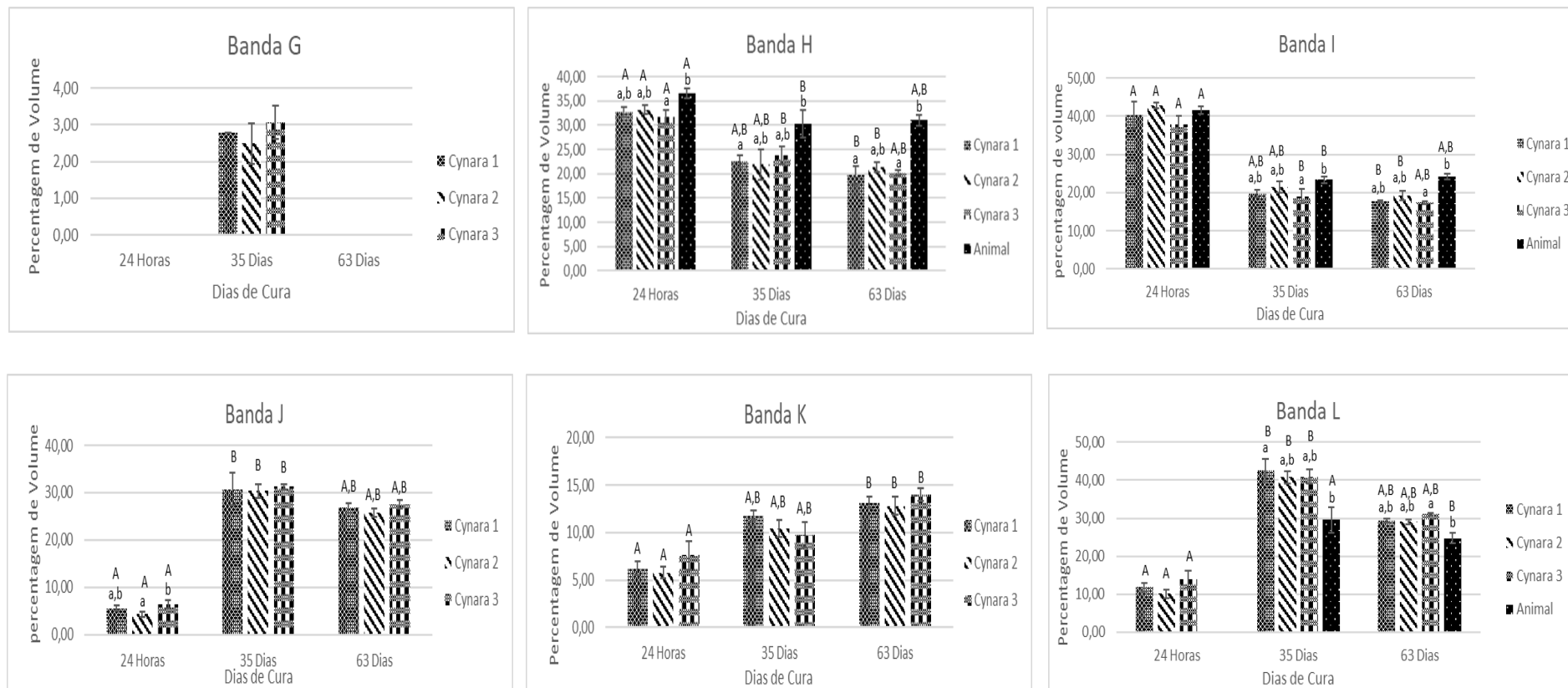


Figura 20 - Gráficos relativos aos níveis de expressão de cada banda, para cada agente coagulante e cada dia de cura. (Letras maiúsculas exprimem as diferenças significativas para um agente coagulante, ao longo dos dias de cura; Letras minúsculas, exprimem entre os agentes coagulantes, para cada dias de cura). Valores de média +/- desvio padrão. * Significativo para $p < 0,05$.

É possível observar duas bandas, J e K (pré- α_s -caseínas), apenas presentes nas frações dos queijos com coagulantes de origem vegetal. Nos queijos com o coalho estas bandas encontram-se unidas, numa banda denominada L.

Observaram-se diferenças nos perfis de caseínas entre os diferentes dias de cura estudados, observando-se também algumas diferenças entre os agentes coagulantes em cada um desses dias (Figura 20) (anexo I)

Nos queijos com 24 horas as bandas A e G (γ -caseínas) não se observaram para nenhum dos agentes coagulantes. Já a banda D (γ -caseínas) também não se observa em nenhum dos agentes coagulantes vegetais, mas observa-se nos queijos produzidos com o agente coagulante animal.

Já as bandas J, K e L (pré- α_s -caseínas) aparecem nos queijos produzidos com qualquer um dos agentes coagulantes vegetais, sem diferenças entre eles e não se observam nos queijos produzidos com o agente coagulante animal. As bandas B, C (γ -caseínas) e I (α_s -caseínas) não apresentaram diferenças entre os agentes coagulantes.

No que diz respeito às bandas E e F (γ -caseínas) apresentam uma tendência para estarem em níveis mais baixos nos queijos produzidos com cardo, comparativamente ao animal, ainda que as diferenças só tenham sido significativas entre o *cynara* 2 e o agente coagulante animal. Às 24 horas, a única diferença entre os agentes coagulantes vegetais foi para a banda J (pré- α_s -caseínas), cujos níveis estavam mais elevados nos queijos obtidos através do uso de *cynara* 3, comparativamente ao uso de *cynara* 1.

Nos queijos com 35 dias de cura, e à semelhança do que se havia observado às 24, as principais diferenças entre agentes coagulantes foram entre os vegetais e o animal. Tanto a banda A como a banda D (γ -caseínas) só se observam nos queijos obtidos a partir do agente coagulante animal. Pelo contrário, as bandas C, G (γ -caseínas), J e K (pré- α_s -caseínas) só não estão presentes nestes queijos, estando naqueles obtidos a partir de qualquer um dos três agentes coagulantes vegetais.

Para as bandas observadas nos perfis de todos os queijos, a H (β -caseína) estava em níveis mais elevados e a L (pré- α_s -caseínas) em níveis mais baixos para o agente coagulante animal, comparativamente aos três *cynaras* estudados. A banda I (α_s -caseína) apresentou-se em níveis mais baixos para os queijos obtidos com *cynara* 3, comparativamente aos restantes (diferenças significativas relativamente ao agente coagulante animal).

Nos queijos com 63 dias de cura, a banda G (γ -caseínas) não foi observada, ao contrário do que aconteceu às 24h e 35 dias. As bandas D (γ -caseínas), J e K (pré- α_s -caseínas) só foram observadas em queijos obtidos através dos agentes coagulantes vegetais, não havendo diferenças entre *cynaras*. As bandas B (γ -caseínas) e L (pré- α_s -caseínas), ainda que presentes, estavam em menores níveis para o agente coagulante animal, por oposição às A (γ -caseínas) e H (β -caseína), que estavam mais elevados para este último.

Aos 63 dias não se observaram diferenças entre *cynaras*, a nível de nenhuma das frações de caseínas.

No que diz respeito à comparação entre as diferentes fases de cura estudadas, há uma tendência para as bandas A e C (γ -caseínas) terem os níveis aumentados, à medida que o tempo de cura avança e a banda I (α -caseína) diminuir. Isto, de um modo geral para os vários agentes coagulantes.

Entre as 24h e os 35 dias as bandas B (γ -caseínas) e I (α -caseína) diminuem e as bandas F (γ -caseínas), J e L (pré- α_s -caseínas) aumentam. Estas variações são mais acentuadas para os agentes coagulantes vegetais do que para o animal. No caso da banda F o aumento só é significativo para o *cynara* 3.

Entre os 35 e os 63 dias há um aumento significativo da banda C (γ -caseínas). Há também tendência para aumento dos níveis das bandas B (γ -caseínas) e K (pré- α_s -caseínas), mas as diferenças não são estatisticamente significativas entre estes dias. No entanto, comparando as 24h com os 63 dias, as diferenças são mais acentuadas, com as bandas A e C (γ -caseínas) mais elevadas, aos 63 dias, para todos os agentes coagulantes e as bandas D, E (γ -caseínas) e K mais elevadas neste último dia, apenas para os agentes coagulantes vegetais.

Podem considerar-se zonas nos géis de ureia-PAGE, a zona onde é possível identificar as γ -caseínas, a β -caseína, a α_s -caseína e por fim as pré- α_s -caseínas (Delgado et al., 2010a; Fernández-Salguero & Sanjuán, 1999; Pino et al., 2009a; Veloso et al., 2002), como se encontra no anexo II.

Deste modo, foram somados os valores das percentagens de volumes para os três dias de cura, das bandas A, B, C, D, E, F e G de modo a determinar o valor percentual do volume da zona das γ -caseínas. As bandas identificadas no gel com as letras H, I e L, correspondem à β -caseína, α_s -caseína e pré- α_s -caseínas, respetivamente (anexo II).

Os perfis da fração de caseínas, dos queijos produzidos com os três ecótipos de *Cynara cardunculus* L., apresentam semelhante comportamento (Figura 21). É possível observar que as γ -caseínas apresentam às 24 horas níveis expressão mais baixos, que vão aumentando ao longo da maturação.

No caso das pré- α_s -caseínas, estas apresentam um aumento dos níveis de expressão, das 24 horas para os 35 dias de cura, e posteriormente até à terceira fase de cura, os níveis de expressão sofrem um decréscimo, para todos os queijos, independentemente do agente coagulante usado.

Contrariamente ao observado nas frações acima referidas, observa-se que as β e α_s caseínas, apresentam um nível de expressão elevado que vai diminuindo até à terceira fase de cura.

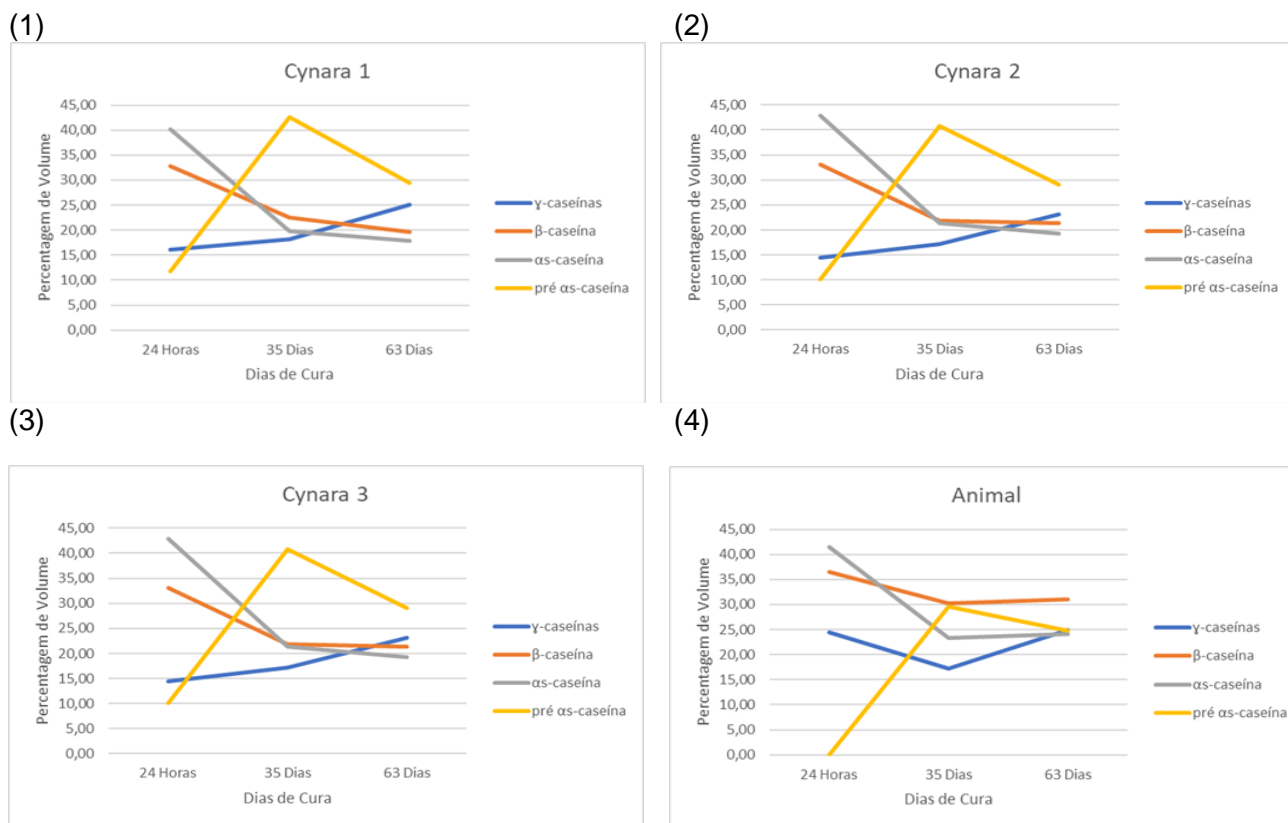


Figura 21- Gráficos que exprimem os níveis de expressão das caseínas ao longo da maturação, para os diferentes agentes coagulantes: (1) Cynara 1; (2) Cynara2; (3) Cynara 3; (4) Agente Coagulante Animal.

Quando analisamos os perfis eletroforéticos, da fração de caseínas, dos queijos com agente coagulante animal, as α_s e β caseínas diminuem os seus níveis de expressão entre a primeira (24 horas) e a segunda (35 dias) fase de cura, mantendo ou aumentando-os ligeiramente até aos 63 dias de cura.

Por fim, as γ -caseínas diminuem os seus níveis entre as 24 e os 35 dias, e aumentam esses níveis até aos 63 dias.

4.3. Estudo e análise da fração proteica solúvel do Queijo de Ovelha por eletroforese Bidimensional

A técnica de eletroforese bidimensional foi usada na separação das proteínas solúveis, uma vez que permite a separação das mesmas não só pela sua massa molecular como também pela sua carga elétrica, procurando uma maior e melhor separação proteica, visto que estas proteínas apresentam massas molecular semelhantes. Na figura 22, observam-se os perfis bidimensionais dos queijos produzidos com os diferentes agentes coagulantes ao longo das fases de cura em estudo. Estes perfis permitem não só observar as diferentes proteínas, como também, possivelmente as diferentes isoformas de uma mesma proteína.

Esta abordagem permitiu observar que existe uma zona onde se deteta a maior variação de spots proteicos, ou seja onde se verifica que existem proteínas que vão variando ao longo das fases de cura estudadas, tendo sido nos queijos fabricados com os ecótipos de cardo, onde particularmente se verificaram variações mais pronunciadas.

Esta zona onde se expressam estas variações mais evidentes no perfil proteico da fração solúvel é no intervalo de massas moleculares entre 10 e 25kDa.

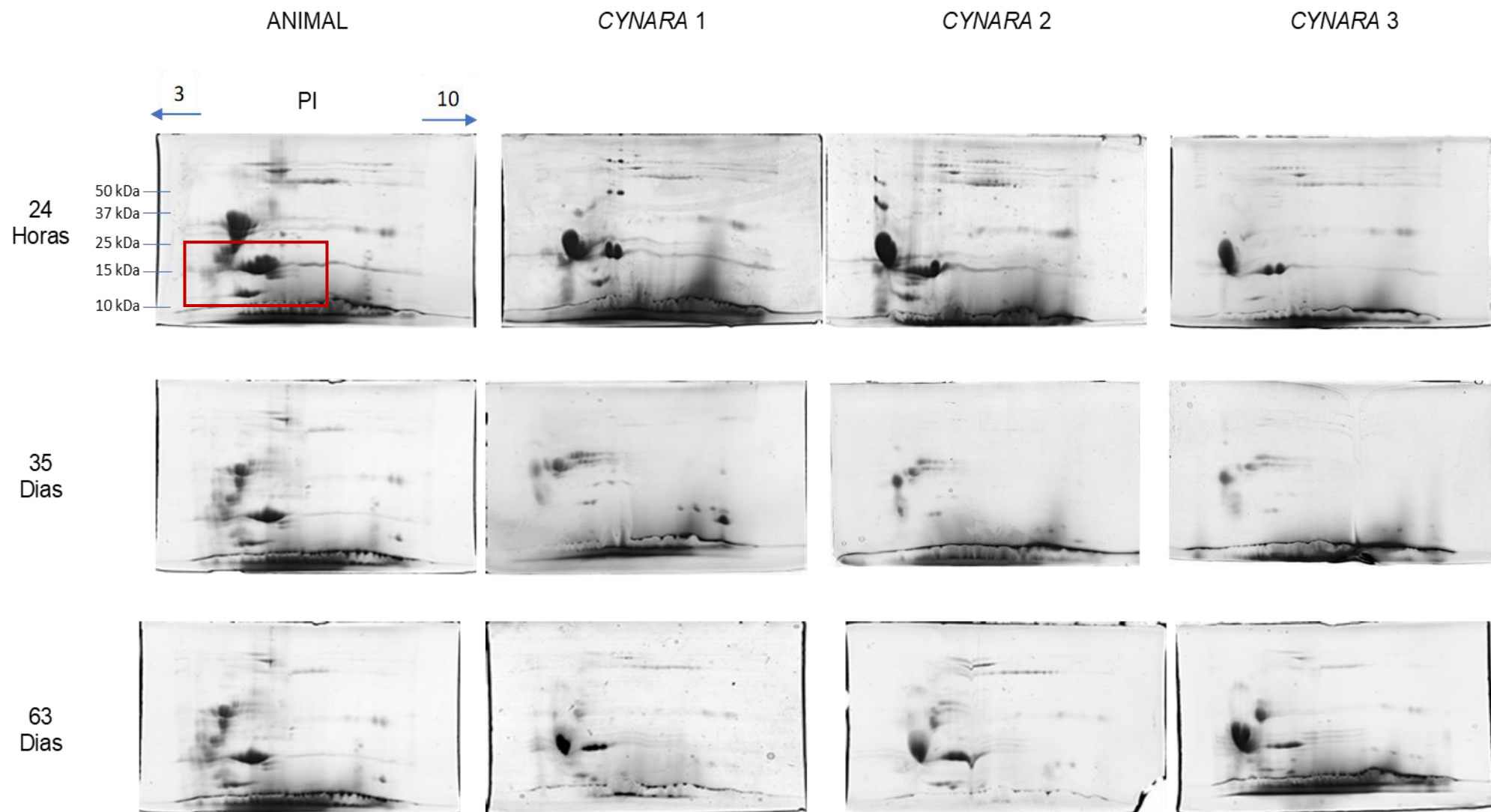


Figura 22 - Perfis Bidimensionais da fração proteica solúvel do queijo para os vários dias de cura e agentes coagulantes, com indicação de algumas massas moleculares e ponto isoelétrico (PI).

Nas figuras 23 e 24 observa-se dois perfis bidimensionais de queijos produzidos com agente coagulante vegetal, *Cynara* 3 e com o agente coagulante animal, aos 63 dias de maturação. Encontram-se expressos os spots proteicos que foram observados e analisados, de modo a compreender as diferenças que se verificam entre agentes coagulantes e entre as diferentes fases de cura. Estas figuras são representativas do tipo de abordagem realizado bem como da análise realizada aos diferentes perfis bidimensionais.

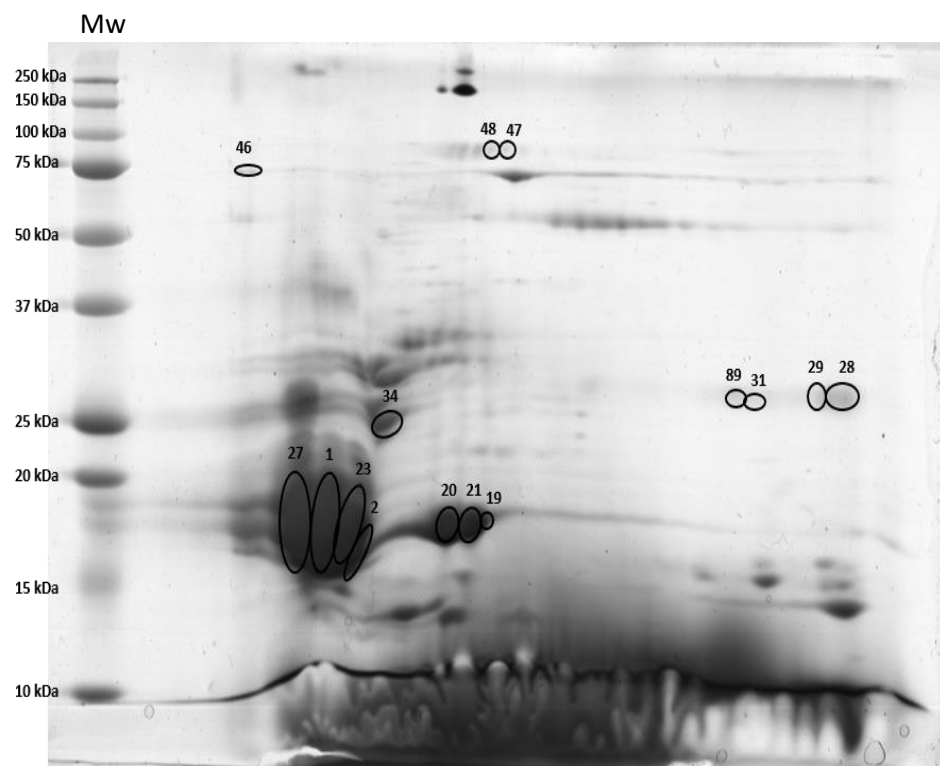


Figura 23 - Perfil Bidimensional da fração proteica solúvel em água, da amostra de queijo com agente coagulante *Cynara* 3, com 63 dias de cura.

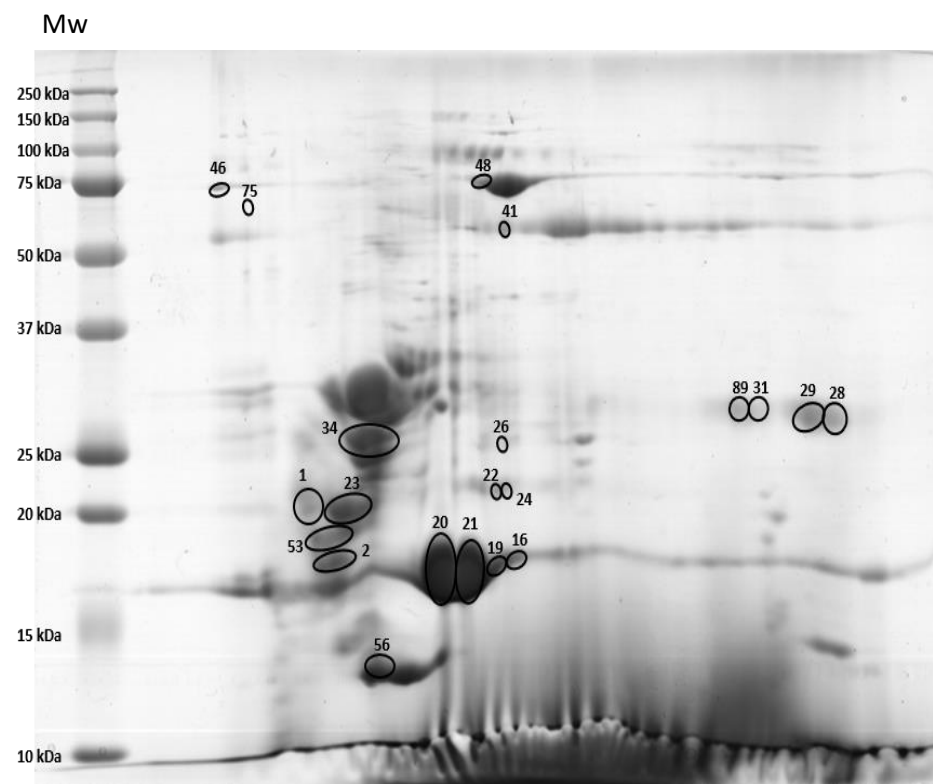


Figura 24 - Perfil Bidimensional da fração proteica solúvel em água, da amostra de queijo com agente coagulante Animal, com 63 dias de cura.

4.3.1. Comparação das concentrações ($\mu\text{g/ml}$) das amostras da fração proteica solúvel dos queijos com os vários agentes coagulantes em estudo, ao longo das fases de cura

Tendo em conta as concentrações das amostras de proteína total da fração proteica solúvel em água (Tabela 4), dos queijos produzidos com os diferentes agentes coagulantes em estudo, comparou-se estes valores de modo a verificar o seu comportamento ao longo das fases de cura.

Tabela 4 - Concentrações das amostras ($\mu\text{g/ml}$) da fração solúvel, em água, de cada agente coagulante e em cada dia de cura, analisadas.

	24 Horas	35 Dias	63 Dias
Animal	3997,59 \pm 358,92 $\mu\text{g/ml}$	34690,98 \pm 37280,49 $\mu\text{g/ml}$	8502,36 \pm 4648,29 $\mu\text{g/ml}$
Cynara 1	3848,68 \pm 245,09 $\mu\text{g/ml}$	64899,63 \pm 7837,97 $\mu\text{g/ml}$	5745,49 \pm 2673,95 $\mu\text{g/ml}$
Cynara 2	2583,24 \pm 458,58 $\mu\text{g/ml}$	43690,50 \pm 34405,57 $\mu\text{g/ml}$	8777,06 \pm 967,62 $\mu\text{g/ml}$
Cynara 3	3044,98 \pm 265,74 $\mu\text{g/ml}$	56155,23 \pm 20171,78 $\mu\text{g/ml}$	6943,42 \pm 3304,31 $\mu\text{g/ml}$

Deste modo, é possível concluir, que embora não existam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os agentes coagulantes, é possível observar que o aumento, das concentrações em todos os agentes coagulantes, é significativo ($p < 0,05$), entre as 24 horas e os 35 dias de cura. Igualmente significativo ($p < 0,05$), verifica-se o decréscimo no valor das concentrações, em todos os agentes coagulantes, entre os 35 e os 63 dias de cura.

Deste modo, podemos concluir que o comportamento de todos os agentes coagulantes em estudo apresenta um comportamento semelhante, como ilustra a figura 25.

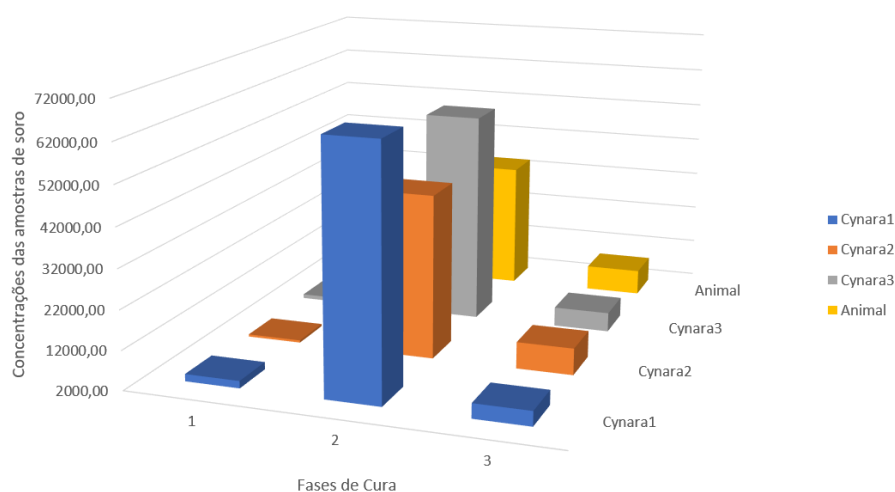


Figura 25 - Variações das concentrações das amostras da fração solúvel, em água, dos vários agentes coagulantes e dias de cura, analisadas. ((1) – 24 horas; (2) – 35 dias; (3) – 63 dias).

4.3.2. Perfil proteico bidimensional fração proteica solúvel dos queijos fabricados com agente coagulante vegetal ao longo dos dias de cura

Como referido para a o estudo da fração de caseínas do queijo de Évora, estudamos os perfis dos queijos fabricados com agentes coagulantes vegetais, de modo a encontrar um perfil proteico bidimensional deste queijo. Tal foi estudado pelo mesmo motivo, o Queijo de Évora DOP ser fabricado só com recurso a coagulante de origem vegetal, *Cynara cardunculus* L. Esta abordagem, permite-nos encontrar um perfil proteico da fração proteica solúvel, específico deste queijo, bem como observar a expressão dos seus compostos proteicos ao longo da maturação não diferenciando os ecótipos de *Cynara cardunculus* L..

Entre as 24 horas e os 35 dias de cura verifica-se uma diminuição significativa ($p < 0,05$) dos níveis de expressão de seis *spots* (1, 20, 21, 22, 47 e 53) e um aumento significativo ($p < 0,05$) dos níveis de expressão de um *spot* proteico (47), como ilustra a figura 26.

Entre os 35 e os 63 dias de cura observa-se uma diminuição significativa ($p < 0,05$) de três *spots* proteicos (22, 24 e 34) e uma tendência para a diminuição de um outro (26), havendo um aumento significativo ($p < 0,05$) de 2 outros *spots* (1 e 20).

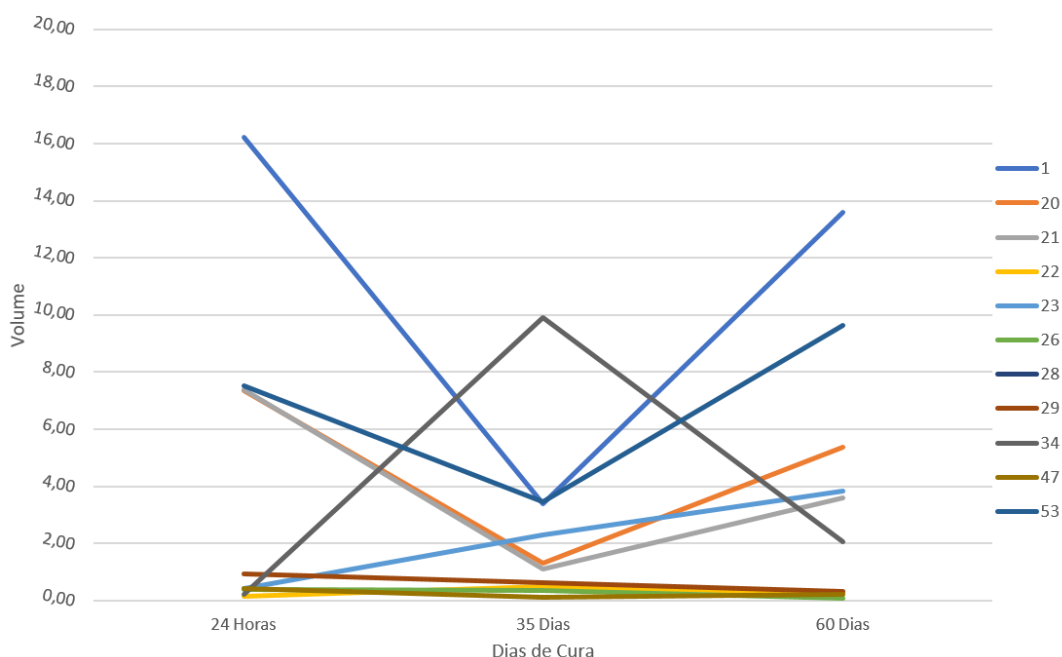
Dos *spots* proteicos cujos níveis diminuíram significativamente ($p < 0,05$) entre as 24 horas e os 35 dias, um deles manteve a sua diminuição até aos 63 dias, enquanto os *spots* 1 e 20 voltaram a aumentar os seus níveis de expressão dos 35 para os 63 dias de cura.

O *spot* 34, que aumentou o seu nível de expressão das 24 horas para os 35 dias de cura, sofreu posteriormente uma diminuição dos 35 dias para os 63 dias (Figura 26).

Tendo em conta que o objetivo desta abordagem prende-se com o estudo e análise dos produtos proteicos resultantes da degradação das caseínas, deve ter-se em conta as proteínas expressas nos géis que apresentam massas moleculares inferiores à das α_s (24,30kDa) e β (26,88kDa) caseínas. Deste modo, pela análise estatística observa-se que as proteínas, expressas nos géis pelos *spots* 1, 20, 21, 22, 23, 24 e 53 apresentam massas moleculares inferiores a 26,87 kDa.

As proteínas expressas nos géis pelos *spots* proteicos 1, 20, 21, 22 e 53 apresentam um comportamento semelhante, ou seja, verifica-se um decréscimo dos seus níveis de expressão das 24 horas para os 35 dias de cura, sendo que desta até à última fase de cura há um aumento dos seus níveis de expressão. O spot 24 apresenta um comportamento inverso aos anteriores.

Relativamente à proteína que se encontra expressa pelo spot 23 apresenta uma tendência para aumentar os seus níveis de expressão ao longo a maturação.



Spots	24 Horas		35 Dias		60 Dias		Massa Molecular (kDa)	Ponto isoelétrico
	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão		
1	16,24 ^a	3,73	3,39 ^b	1,58	13,60 ^a	4,48	20,68	4,5
20	7,36 ^a	2,12	1,30 ^b	0,49	5,38 ^a	2,69	17,75	5,3
21	7,38 ^a	4,05	1,11 ^b	0,72	3,58 ^{a,b}	0,57	17,77	5,5
22	0,13 ^a	0,09	0,48 ^b	0,17	0,25 ^a	0,10	22,22	5,6
23	0,42 ^a	0,27	2,31 ^{a,b}	1,33	3,85 ^b	0,81	19,09	5,8
24	0,07	-	0,65	0,21	0,20	0,08	21,91	5,6
26	0,37	0,23	0,36	0,21	0,08	0,03	26,07	5,5
28	1,70	0,15	-	-	0,40	0,28	29,48	8,5
34	0,21 ^a	0,04	9,90 ^b	3,73	2,06 ^c	1,53	27,82	4,9
47	0,41 ^a	0,14	0,11 ^b	0,06	0,21 ^{a,b}	0,07	91,28	5,7
53	7,51 ^a	3,66	3,45 ^b	1,52	9,65 ^{a,b}	1,91	19,50	4,6

Figura 26 - Análise descritiva e representação gráfica dos spots que apresentam diferenças significativas ($p < 0,05$) ao longo dos dias de cura, no Queijo de Évora.

4.3.3. Perfil proteico bidimensional da fração proteica solúvel dos queijos fabricados com agente coagulante vegetal e animal ao longo dos dias de cura

Esta análise realizou-se tendo em conta os *spots* que se podiam observar em todos os géis, tanto nos perfis do queijo fabricado com coagulante vegetal, como nos perfis da fração proteica solúvel com coagulante animal.

Comparando estatisticamente, os perfis da fração proteica solúvel dos queijos produzidos com os agentes coagulantes vegetais e com os dos queijos fabricados com coagulante animal, é possível observar que entre as proteínas existem diferenças significativas ($p < 0,05$), como se observa na tabela 5 (Anexo III).

É possível observar que para os *spots* 1, 20, 31 e 34 há interação significativa ($p < 0,05$) entre os dias de cura e os agentes coagulantes (animal e vegetal) (Figura 27).

Pelo tratamento estatístico, observam-se diferenças significativas ($p < 0,05$), nos níveis de expressão das proteínas, identificadas pelos *spots* 2, 48 e 53 entre os agentes coagulantes (Figura 27).

Por fim, verificam-se diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os dias de cura nos níveis de expressão das proteínas 22 e 24.

Tabela 5 - Tabela das significâncias do tratamento estatístico de comparação entre o coagulante de origem animal e vegetal. (**) - valor $p < 0,05$; (***) - valor $p < 0,01$ (n. s.) - não significativo

Spots	Significância		
	Dias de cura	Agente coagulante	DiaCura*AgCoagulante
1	**	***	***
2	n. s.	**	n. s.
20	**	n. s.	**
22	***	n. s.	n. s.
24	***	n. s.	n. s.
31	n. s.	n. s.	**
34	***	***	***
48	n. s.	**	n. s.
53	n. s.	***	n. s.



Figura 27 - Representação gráfica da variação dos níveis de expressão dos spots, que apresentam diferenças significativas entre agentes coagulantes animal e vegetal, para os vários dias de cura.

4.3.4. Comparação dos perfis proteicos entre os vários agentes coagulantes, para cada dia de cura

Procurou-se uma abordagem que comparasse as fases de cura para cada agente coagulante, em estudo, de modo a avaliar as alterações nestas proteínas ao longo da maturação, como podemos observar na tabela 6 e figura 28.

Os resultados evidenciam as proteínas que apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$, para cada agente coagulante ao longo das fases de cura (Tabela 6).

Relativamente aos perfis da fração proteica solúvel, dos queijos produzidos com o agente coagulante animal, é possível evidenciar que para três *spots* foram observadas diferenças significativas ao longo da maturação. O *spot* 26 apresentou uma diminuição significativa ($p < 0,05$) do seu nível de expressão entre os dias de cura, 24 horas e 35 dias e entre as 24 horas e os 63 dias.

Contrariamente, os *spots* 46 e 56, apresentam um aumento significativo ($p < 0,05$) do seu nível de expressão entre as 24 horas e os 63 dias de cura (Tabela 6)

Estudando o comportamento das proteínas da fração proteica solúvel dos queijos produzidos com agente coagulante vegetal, *Cynara cardunculus* L. 1, é possível observar que, quatro proteínas apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$) no seu nível de expressão ao longo da maturação (23, 34, 39, 75). A proteína expressa pelo *spot* 23 apresenta um aumento significativo ($p < 0,05$), do seu nível de expressão, entre as 24 horas e os 35 dias de cura. As restantes proteínas apresentam um decréscimo significativo ($p < 0,05$) do seu nível de expressão, como é possível observar na tabela 6.

Tabela 6 - Análise descritiva dos níveis de expressão dos spots que apresentam diferenças significativas para cada agente coagulante, em estudo, tendo em conta os vários dias de cura.

	Spots	24 Horas		35 Dias		60 Dias				
		Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	p-value	Massa Molecular	Ponto isoelétrico
Animal	26	0,43 ^a	0,069	0,229 ^b	0,038	0,229 ^b	0,010	0,034	26,07	5,5
	46	0,042 ^a	0,000	0,061 ^{a,b}		0,081 ^b	0,005	0,013	79,85	3,4
	56	0,102 ^a	0,058	0,552 ^{a,b}		0,516 ^b	0,017	0,017	13,77	5,1
Cynara 1	23	0,353	0,398	3,544	0,845			0,040	19,09	5,8
	34	0,245		9,861 ^a	0,301	1,275 ^b	1,148	0,014	27,82	4,9
	39	0,230 ^a	0,154	1,133		0,173 ^b	0,016	0,033	57,33	5,5
	75	0,137 ^a	0,008	0,509		0,116 ^b	0,014	0,002	74,95	3,9
Cynara 2	1	15,855 ^a	0,960	3,791 ^b	0,134	13,453 ^a	0,876	0,001	20,68	4,5
Cynara 3	19	1,096	0,089			0,482	0,139	0,034	18,39	5,6
	20	7,736 ^a	0,232	1,369 ^b	0,971	2,804 ^b	0,386	0,004	17,75	5,3
	28	1,788	0,190			0,564	0,023	0,012	29,48	8,5
	31	1,202 ^a	0,123	0,108		0,583 ^b	0,121	0,033	29,16	6,9
	41	0,501	0,082			0,126	0,058	0,034	65,37	5,6
	47	0,459 ^a	0,024	0,092 ^b	0,070	0,131		0,035	91,28	5,7

Para os queijos fabricados com agente coagulante vegetal, *Cynara cardunculus* L. 2, apenas a proteína representada pelo spot 1 apresenta diferenças significativas ($p < 0,05$) entre fases de cura, com uma diminuição entre as 24 horas e os 35 dias e um aumento significativo ($p < 0,05$) entre os 35 e os 63 dias de cura.

Por fim, tendo em conto os perfis da fração proteica solúvel dos queijos fabricados com o agente coagulante, *Cynara cardunculus* L. 3, é possível observar que há diferenças significativas ($p < 0,05$), em seis proteínas (19, 20, 28, 31, 41, 47), do seu nível de expressão ao longo da maturação. Note-se que os níveis de expressão destas proteínas apresentam um decréscimo significativo ($p < 0,05$), ao longo das fases de cura, como é possível observar na tabela 6 (Anexo IV).

4.3.5. Comparação das proteínas da fração proteica solúvel ao longo dos vários dias de cura.

Procurou-se comparar os vários perfis da fração proteica solúvel de queijos, produzidos com os agentes coagulantes em estudo, para cada dia de cura.

Como resultado desta análise foi possível observar quais as proteínas que evidenciam diferenças significativas ($p < 0,05$), no seu nível de expressão, entre os vários agentes coagulantes (Tabela 7).

Tendo em conta o primeiro dia de cura (24 horas) observa-se que existem diferenças significativas ($p < 0,05$), em dez proteínas, entre os vários agentes coagulantes como é possível observar na tabela 7.

Para os *spots* 16, 22, 23, 28, 34, 47, existem diferenças significativas ($p < 0,05$), para o dia de cura 24 horas (Tabela 7), entre os agentes coagulantes.

Deste modo, observam-se diferenças significativas ($p < 0,05$) no nível de expressão da proteína, correspondente ao *spot* 1, entre os perfis dos queijos produzidos com o agente coagulante animal e *Cynara* 3. Para os *spots* 2 e 31, é possível observar diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os agentes coagulantes animal e *Cynara* 3 e também entre os *Cynara* 2 e 3. Em todos os casos referidos o nível de expressão da proteína é inferior nos queijos produzidos com agente coagulante animal (Figura 28).

Por fim, observa-se que no *spot* 89, o nível de expressão da proteína é significativamente ($p < 0,05$) inferior na fração proteica solúvel dos queijos produzidos com coagulante animal, quando comparados com os *Cynaras* 1 e 2.

Aos 35 dias de cura apenas se observam diferenças significativas ($p < 0,05$) para o *spot* 2. Este apresenta-se significativamente ($p < 0,05$) superior na fração proteica solúvel dos queijos com agente coagulante animal quando comparado com qualquer um dos agentes coagulantes vegetais em estudo.

Para os 63 dias de cura, sete proteínas apresentam diferenças significativas do seu nível de expressão, entre a fração proteica solúvel dos queijos produzidos com os vários agentes coagulantes (21, 28, 29, 34, 46, 48, 53), como ilustra a tabela 7 (Anexo IV).

Mais especificamente o nível de expressão da proteína, representada pelo *spot* 34, apresenta-se significativamente ($p < 0,05$) superior na fração proteica solúvel dos queijos com coagulante animal relativamente aos restantes. Contrariamente, para o *spot* 53, o nível de expressão apresenta-se significativamente inferior no soro dos queijos obtidos com o coagulante animal

relativamente à fração proteica solúvel dos queijos produzidos com os agentes coagulantes *Cynara* 1 e 2.

Tabela 7 - Análise descritiva dos níveis de expressão dos spots que apresentam diferenças significativas em cada dia de cura, entre os agentes coagulantes em estudo.

	Spots	Animal		Cynara 1		Cynara 2		Cynara 3				
		Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	p-value	Massa Molecular	Ponto isoelétrico
24 Horas	1	1,66 ^a	0,45	14,60 ^{a,b}	7,37	15,85 ^{a,b}	0,96	18,24 ^b	0,80	0,037	20,68	4,5
	2	1,07 ^a	0,46	3,94 ^{a,b}	0,59	1,83 ^a	1,85	8,11 ^b	1,84	0,022	16,99	4,8
	16	0,26	0,01	0,60	0,14	1,36	0,15			0,006	20,45	5,6
	22	0,07	0,00	0,20		0,07				0,007	22,22	5,6
	23	4,70	1,64	0,35	0,40			0,50	0,18	0,035	19,09	5,8
	28	0,89	0,06			1,61	0,02	1,79	0,19	0,009	29,48	8,5
	31	0,50 ^a	0,01	0,65 ^{a,b}	0,08	0,42 ^a	0,24	1,20 ^b	0,12	0,017	29,16	6,9
	34	22,33	3,69	0,24		0,17		0,22		0,031	27,82	4,9
	47	0,07		0,28	0,04	0,60		0,46	0,02	0,019	91,28	5,7
35 Dias	89	0,18 ^a	0,02	0,52 ^b	0,07	0,19 ^a	0,09	0,26 ^{a,b}	0,11	0,034	21,17	6,5
	20	5,66 ^a	1,76	1,33 ^b	0,23	1,19 ^b	0,40	1,37 ^b	0,97	0,03	17,75	5,3
60 Dias	21	6,39	1,00	3,75	1,00	3,30	0,62	3,69	0,01	0,049	17,77	5,5
	28	0,92	0,01	0,07				0,56	0,02	0,001	29,48	8,5
	29	0,70	0,05	0,27	0,04	0,36		0,38	0,02	0,005	29,73	7,8
	34	8,50 ^a	0,21	1,27 ^b	1,15	1,24 ^b	0,61	3,67 ^b	1,49	0,005	27,82	4,9
	46	0,08	0,005	0,11		0,14		0,06	0,01	0,025	79,85	3,4
	48	0,68	0,06	0,20	0,18	0,69	0,13	0,17	0,02	0,017	88,15	5,6
	53	0,69 ^a	0,32	10,43 ^b	2,62	8,87 ^b	1,25	5,52 ^{a,b}	1,56	0,015	19,50	4,6

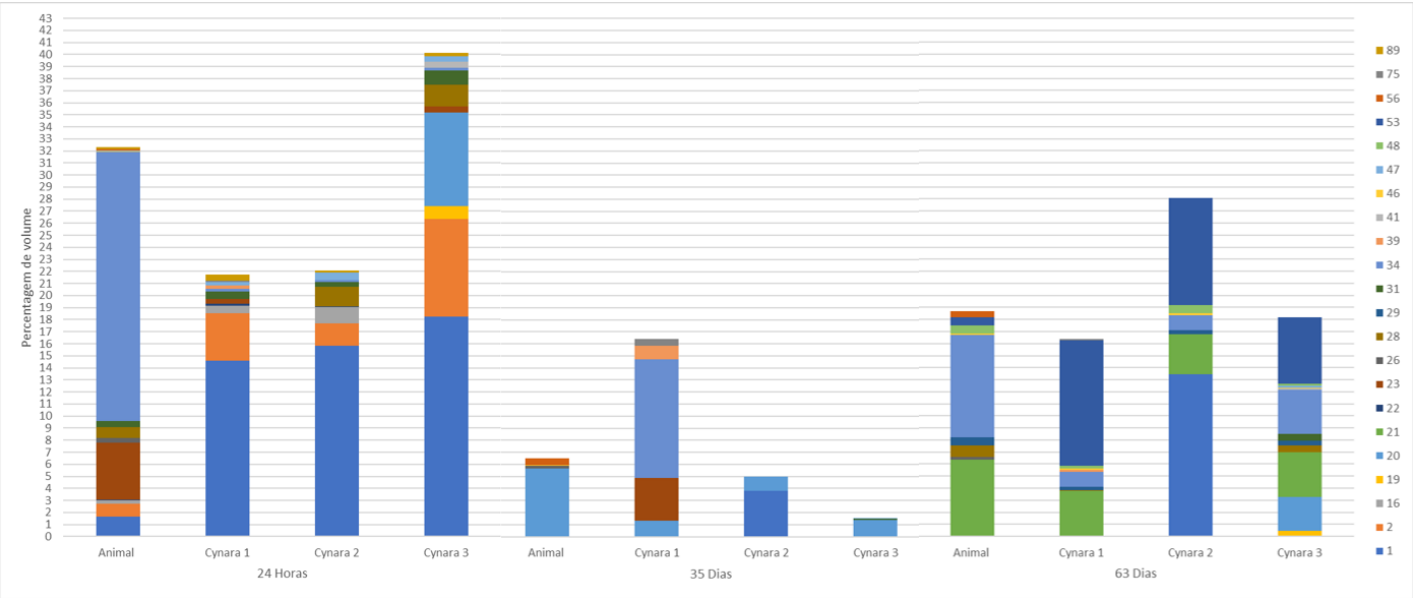


Figura 28 - Representação gráfica dos spots que apresentam diferenças significativas ($p<0,05$), entre os dias de cura e os agentes coagulantes (Anexo IV).

5. Discussão

Tendo em conta que o Queijo de Évora difere de outros queijos de ovelha em termos de composição e que o número de estudos acerca das variações no perfil proteico de caseínas, ao longo da maturação, é reduzido, foi necessária a otimização das técnicas a usar para o estudo da proteólise. Os queijos de Évora apresentam um elevado teor de gordura, como descrito no Despacho 29/94 de 4 de Fevereiro (1994), entre 45 a 60% de matéria gorda no extrato seco. Deste modo, foi necessário adaptar a técnica de extração das caseínas, tendo por base a técnica usada Ordiales *et al.* (2013), de modo a que a gordura e o precipitado fossem possíveis de separar. Esta otimização passou pela otimização da quantidade a usar, diminuição da temperatura e aumento da velocidade de centrifugação.

De entre as duas técnicas de eletroforese em Gel de Poliacrilamida, a que melhor permitiu a visualização, estudo e análise do perfil proteico das caseínas do Queijo de Évora foi a eletroforese em gel de poliacrilamida com ureia. Esta técnica já usada para este fim por muitos investigadores como Fernández-Salguero e Sanjuán (1999), Ordiales *et al.* (2013), Delgado *et al.* (2010) e Pino *et al.* (2009).

Esta técnica, permite uma maior separação das caseínas constituintes do queijo, uma vez que separa as proteínas tendo em conta a sua mobilidade em gel, que se deve à carga que cada proteína tem para o pH do gel e tampão de corrida. No caso específico destas proteínas que têm pontos isoelétricos próximos de 4,6 e isoformas com massas moleculares semelhantes, a separação por ureia-PAGE, entre formas diferentes é maior do que quando se realiza uma separação por SDS-PAGE. Isto porque nesta última, a migração das proteínas resulta exclusivamente das suas massas moleculares, uma vez que o SDS confere uma carga negativa às proteínas, proporcional ao número de aminoácidos, anulando a sua carga nativa. Deste modo, especificamente a α_s e β caseínas, que apresentam uma massa molecular com valores muito próximos, não são facilmente separadas (UniProt, n.d.).

Tendo em conta a bibliografia e pela posição das bandas no géis de ureia-PAGE, foi possível identificar as principais frações de caseínas que permitem o

estudo da proteólise no queijo, como as γ , β , α_s e pré- α_s caseínas (Delgado et al., 2010a; Fernández-Salguero & Sanjuán, 1999; Irigoyen, Izco, Ibáñez, & Torre, 2001; Ordiales et al., 2013b; Pino et al., 2009a; Veloso et al., 2002).

Como referido anteriormente, este ensaio foi realizado com queijos produzidos através da utilização de quatro agentes coagulantes distintos, três ecótipos de *Cynara cardunculus* L. e um agente coagulante de origem animal.

A primeira abordagem efetuada procurou comparar os queijos produzidos com agentes coagulantes vegetais com aqueles produzidos com o agente coagulante animal.

Como referido pelo autor Ordiales *et al.* (2013), e coincidente com os resultados das análises realizadas, é notória a degradação das caseínas ao longo do processo de maturação e isso acontece com ambos os tipos de agentes coagulantes.

De um modo geral, as caseínas dos queijos produzidos com *Cynara cardunculus* L., sofreram uma maior degradação proteica das formas α_s e β , quando comparados com os queijos fabricados com coagulante animal. Tal resultado coincide com o obtido pelos investigadores Fernández-Salguero e Sanjuán (1999), que observaram a influência dos agentes coagulantes animal e vegetal na proteólise durante a maturação, em queijos fabricados com leite de ovelha e que concluíram que a hidrólise das caseínas era mais acentuada e mais rápida no queijo fabricado com recurso ao agente coagulante vegetal.

Analisando os níveis de expressão das proteínas, é possível concluir que a α_s -caseína sofre uma degradação mais acentuada que a β -caseína, nos queijos produzidos com coagulante de origem vegetal. Tal é também descrito pelos mesmos autores, atribuindo este facto à resistência que a β -caseína apresenta à hidrólise.

É também sugerido por Macedo e Malcata (1996) citado por Ordiales (2013), que a velocidade da hidrólise da β -caseína possa estar relacionada com o agente coagulante. Deste modo, pelos resultados obtidos, podemos sugerir que a degradação desta caseína é mais extensa nos queijos fabricados com

agente coagulante vegetal, o que vai de encontro ao concluído igualmente por Fernández-Salguero e Sanjuán (1999).

A nível da α_s -caseína, os autores Pino *et al.* (2009), referiram que a mesma, é mais degradada nos queijos usando o agente coagulante vegetal, do que naqueles onde se usa o agente coagulante animal, o que também foi observado nos perfis de ureia-PAGE realizados.

Segundo Fernández-Salguero e Sanjuán (1999), a fração de γ -caseínas, resulta da ação hidrolítica de proteases alcalinas e enzimas microbianas nas β -caseínas de ovino. Como resultado da sua degradação, é de esperar que a diminuição dos níveis de expressão desta caseína se traduzam num aumento dos níveis de expressão das γ -caseínas. Neste estudo, este último grupo de caseínas, (representado nas bandas A, B, C, D, E, F e G dos perfis de ureia-PAGE), para os queijos com agente coagulante animal, mantém o seu nível de expressão entre as duas ultimas fases de cura, o que supomos ser explicado pela menor atividade proteolítica deste tipo de agente coagulante, relativamente ao agente coagulante vegetal, como refere o autor Pino *et al.* (2009).

No que diz respeito à fração proteica solúvel, é expectável que este contenha proteínas naturalmente presentes no soro do leite, como β -lactoglobulina, α -lactalbumina, albumina sérica, imunoglobulina e lactoferrina, (David, 1982; Nudda, Feligini, Battaccone, Macciotta, & Pulina, 2003) e ao longo do processo de maturação dos queijos comece a conter produtos de degradação (proteólise) das caseínas. Em termos de quantidade de proteína total presente nesta fração, ao comparar as concentrações ($\mu\text{g/ml}$) proteicas das amostras da fração proteica solúvel, entre os vários agentes coagulantes em estudo, pode concluir-se que o agente coagulante animal resulta numa tendência para menor quantidade de proteína total neste fração, aos 35 dias de cura. Tal facto pode ser explicado, pela aparentemente menor degradação das caseínas nos queijos produzidos com o coagulante animal, e observada por nós e outros autores (Fernández-Salguero & Sanjuán, 1999). Assim, será de esperar o aparecimento de menos produtos, solúveis em água, resultantes da degradação das caseínas do queijo.

Neste trabalho não foi possível obter a identificação das proteínas diferencialmente expressas entre os agentes coagulantes e/ou dias de cura. No entanto, segundo os resultados obtidos por ureia-PAGE, a degradação da α_s -caseína (presente na banda I) é superior à degradação da β -caseína (presente na banda H), principalmente no caso dos queijos obtidos através da utilização de agente coagulante vegetal. Assim, podemos colocar a hipótese de uma maior existência de produtos peptídicos resultantes da hidrólise da α_s -caseína presentes, na fração solúvel em água.

Por outro lado, é expectável que nas primeiras fases de maturação as proteínas mais abundantes na fração solúvel em água sejam aquelas habitualmente presentes no soro do leite. À medida que avança o processo de maturação é expectável que estas diminuam e que os compostos azotados que resultam da hidrólise das caseínas aumentem, aparecendo na fração solúvel em água do queijo (Ordiales et al., 2013b)

Segundo Ordiales et al., 2013, a quantidade total de proteínas solúveis em água aumenta ao longo da maturação tendo em conta que, a degradação das caseínas, por hidrólise, também aumenta ao longo do tempo de cura. Como produtos da degradação das caseínas surgem péptidos, que constituem a fração proteica solúvel em água, do queijo.

Os resultados obtidos, para a concentração em proteína total da fração solúvel em água das amostras de queijo de Évora, vão de encontro com o observado, pelos investigadores acima referidos, tendo em conta que em ambos os estudos, observa-se que a concentração de proteínas solúveis em água aumenta do primeiro dia de cura (24 horas/2 dias) para o segundo dia de cura analisado (30/35 dias).

Ordiales et al. (2013) também estudaram a proteólise das caseínas analisando, por um lado, os perfis ureia-PAGE das caseínas e, por outro lado, o perfil SDS-PAGE do soro. Estes autores observaram um aumento de bandas proteicas, das amostras da fração proteica solúvel, com massas moleculares compreendidas entre 10 e 25kDa, ao longo da maturação. Também foi a nível de *spots* proteicos com essas massas moleculares aparentes que, nestes

estudos, observamos maiores variações, particularmente para os queijos obtidos com o agente coagulante vegetal.

Os queijos em estudo foram produzidos a partir de leite cru de ovelha. Como sugere Roseiro *et al.* (2003), e Galán *et al.* (2012), os compostos azotados solúveis surgem, inicialmente devido à ação das proteases do agente coagulante vegetal, *Cynara cardunculus*. Posteriormente, e a partir do meio da maturação até ao final, atuam os microrganismos e peptidases da microflora indígena, como responsáveis pela proteólise, contribuindo significativamente para a hidrólise das caseínas. Neste trabalho, a concentração proteica da fração proteica solúvel diminui dos 35 para os 63 dias de cura. Deste modo, é possível pensar que este decréscimo resulte influenciado pela ação destes microrganismos, que poderão usar e ou transformar os péptidos noutros compostos não proteicos (Pinheiro, 2002). O facto de não se observar uma diferença em termos de quantidade total de *spots* proteicos, ao longo da maturação, não tem a ver com o facto de a quantidade em proteínas/péptidos não diminuir, mas sim com a metodologia utilizada. Nos géis de eletroforese bidimensional foi separada a mesma quantidade de proteína total. Ou seja, as alterações que conseguimos observar nesses perfis dizem respeito a alterações nas proporções das diferentes proteínas, ao longo das fases de maturação e entre agentes coagulantes. E pelos resultados obtidos, observa-se que as composições das frações proteicas solúveis dos queijos obtidos a partir de um agente coagulante animal são diferentes daqueles obtidos a partir dos agentes coagulantes vegetais. Mesmo entre os três agentes coagulantes vegetais há diferenças. É importante, no futuro, identificar as proteínas diferencialmente expressas entre as situações estudadas, de modo a melhor compreender o processo de proteólise das caseínas ao longo da maturação do Queijo de Évora, bem como para compreender as diferenças que os diferentes ecótipos de cardo podem ter em termos dessa proteólise.

6. Conclusão

Existem inúmeros estudos para avaliar a proteólise no queijo de ovelha, embora sejam diminutos aqueles que se referem ao Queijo de Évora DOP. Deste modo, otimizou-se a técnica de extração das caseínas, tendo em conta que esta variedade de queijo apresenta especificidades próprias como o seu elevado teor de gordura. Esta técnica foi otimizada com sucesso e permitiu a posterior separação das diferentes isoformas constituintes desta fração proteica por técnicas de eletroforese.

Das técnicas utilizadas para a avaliação da fração de caseínas (fração insolúvel) a que melhor permitiu esta separação, foi a técnica de ureia-PAGE, uma vez que pela técnica de SDS-PAGE não foi possível distinguir as principais frações de caseínas (α_s e β), devido à elevada proximidade das suas massas moleculares. Deste modo, a técnica de ureia-PAGE permitiu a identificação de diversas frações de caseínas, as α_s , β , γ e pré- α_s caseínas, bem como a observação da sua degradação ao longo das fases de cura analisadas (24 horas, 35 e 63 dias).

Relativamente ao efeito do agente coagulante para proteólise do queijo, concluiu-se que esta se apresenta mais extensa nos queijos fabricados com agente coagulante vegetal quando comparados com o agente de controlo, coagulante animal, ou seja, verifica-se uma maior degradação (hidrólise) das caseínas ao longo da maturação. De uma forma mais específica, a α_s -caseína apresenta uma maior degradação que a β -caseína nos queijos produzidos com agente coagulante vegetal. Já as diferenças observadas entre os três agentes coagulantes vegetais utilizados são menos pronunciadas, ainda que para algumas proteínas isso aconteça.

Pela eletroforese bidimensional, separam-se os compostos proteicos, da fração proteica solúvel. Embora não tenha sido possível a identificação das proteínas, visualizadas no gel, é expectável que ao longo da maturação dos queijos esta fração comece a conter produtos de degradação (proteólise) das caseínas. Podemos colocar a hipótese de uma maior existência de produtos peptídicos resultantes da hidrólise da α_s -caseína presentes, na fração solúvel em água, uma vez que esta é a que sofre uma maior hidrólise.

Pela determinação da quantidade de proteína total presente nesta fração, pode concluir-se que o agente coagulante animal resulta numa tendência para menor quantidade de proteína total na fração proteica solúvel, aos 35 dias de cura, podendo ser explicado, pela aparentemente menor degradação das caseínas nos queijos produzidos com o coagulante animal, comparativamente aos vegetais.

Observou-se uma maior variação dos níveis de bandas proteicas, das amostras da fração proteica solúvel, com massas moleculares compreendidas entre 10 e 25kDa, ao longo da maturação, particularmente para os queijos obtidos com o agente coagulante vegetal, sugerindo que nesse intervalo de massas moleculares estejam expressos os produtos da degradação das caseínas.

Por fim, pelos resultados obtidos, observa-se que as composições das frações proteicas solúveis dos queijos obtidos a partir de um agente coagulante animal são diferentes daqueles obtidos a partir dos agentes coagulantes vegetais. Mesmo entre os três agentes coagulantes vegetais há diferenças.

As técnicas de eletroforese unidimensional (ureia-PAGE) e bidimensional complementam-se no estudo da proteólise do Queijo de Évora, podendo ser um ponto de partida para futuros estudos e investigações nesta área de conhecimento.

Para trabalhos futuros a identificação das proteínas diferencialmente expressas é de elevada importância, de modo a compreender o processo da proteólise das caseínas no Queijo de Évora.

7. Bibliografia

- Berkelman, T., & García-Carreño, F. (2001). Electrophoresis Analysis. In *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*. John Wiley & Sons, Inc.
- Borková, M., & Snášelová, J. (2005). Possibilities of different animal milk detection in milk and dairy products - A review. *Czech Journal of Food Sciences*.
- Coagulantes en la industria lactea. (2012). Retrieved March 12, 2018, from <https://es.slideshare.net/FUSADESORG/4-coagulantes-en-la-industria-lactea>
- Cristian M. de Magalhães, M. V. dos S. (2017). Factores que alteram a estabilidade do leite. Retrieved March 12, 2018, from <http://cienciadoleite.com.br/noticia/3821/fatores-que-alteram-a-estabilidade-do-leite>
- Dalgleish, D. G. (1993). The enzymatic coagulation in milk. In P. F. Fox (Ed.), *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology* (volume 1, pp. 69–100). London, UK: Chapman & Hall.
- David, M. T. C. M. (1982). *Contribuição para o estudo de algumas variedades de queijos*. Universade Técnica de Lisboa, Instituto Superior de Agronomia.
- Delgado, F. J., Rodríguez-Pinilla, J., González-Crespo, J., Ramírez, R., & Roa, I. (2010a). Proteolysis and texture changes of a Spanish soft cheese ('Torta del Casar') manufactured with raw ewe milk and vegetable rennet during ripening. *International Journal of Food Science and Technology*. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2009.02157.x>
- Delgado, F. J., Rodríguez-Pinilla, J., González-Crespo, J., Ramírez, R., & Roa, I. (2010b). Proteolysis and texture changes of a Spanish soft cheese ('Torta del Casar') manufactured with raw ewe milk and vegetable rennet during ripening. *International Journal of Food Science and Technology*, 45(3), 512–419. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2009.02157.x>

- Dias, S. M. P. (1997). *Caraterização das leveduras presentes na massa do queijo artesanal de Évora*. Universidade de Évora.
- Egito, A. S., Rosinha, G. M. S., Laguna, L. E., Miclo, L., Girardet, J. M., & Gaillard, J. L. (2006). Fast electrophoretic detection method of adulteration of caprine milk by bovine milk. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria E Zootecnia*, 58(5), 932–939. <http://doi.org/10.1590/S0102-09352006000500032>
- Fernández-Salguero, J., & Sanjuán, E. (1999). Influence of vegetable and animal rennet on proteolysis during ripening in ewes' milk cheese. *Food Chemistry*, 64(2), 177–183. [http://doi.org/10.1016/S0308-8146\(98\)00149-6](http://doi.org/10.1016/S0308-8146(98)00149-6)
- Fox, P. F. (1993a). *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*. (P. F. Fox, Ed.) (vol. 1, 2n). London, UK: Chapman & Hall.
- Fox, P. F. (1993b). *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*. (P. F. Fox, Ed.) (volume 2,). London, UK: Chapman & Hall.
- Fox, P. F., Guinee, T. P., Cogan, T. M., & McSweeney, P. L. (2000). Fundamentals of cheese science. In *Fundamentals of cheese science*.
- Fox, P. F., & McSweeney, P. L. H. (1996). Proteolysis in cheese during ripening. *Food Reviews International*, 12, 457–509.
- Galán, E., Cabezas, L., & Fernández-Salguero, J. (2012). Proteolysis, microbiology and sensory properties of ewes' milk cheese produced with plant coagulant from cardoon *Cynara cardunculus*, calf rennet or a mixture thereof. *International Dairy Journal*, 25(2), 92–96. <http://doi.org/10.1016/j.idairyj.2012.02.001>
- Galán, E., Prados, F., Pino, A., Tejada, L., & Fernández-Salguero, J. (2008). Influence of different amounts of vegetable coagulant from cardoon *Cynara cardunculus* and calf rennet on the proteolysis and sensory characteristics of cheeses made with sheep milk. *International Dairy Journal*, 18(1), 93–98.
- Green, M. L., & Grandison, A. S. (1993). Secondary (non-enzymatic) phase of rennet coagulation and post coagulation phenomena. In P. F. Fox (Ed.),

- Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology, Vol. 2.* (2nd ed., pp. 101–140). London, UK: Chapman & Hall.
- Guerreiro, J. S., Barros, M., Fernandes, P., Pires, P., & Bardsley, R. (2013). Principal component analysis of proteolytic profiles as markers of authenticity of PDO cheeses. *Food Chemistry*.
<http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.02.066>
- Irigoyen, A., Izco, J. M., Ibáñez, F. C., & Torre, P. (2000). Evaluation of the effect of rennet type on casein proteolysis in an ovine milk cheese by means of capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*.
[http://doi.org/10.1016/S0021-9673\(99\)01276-5](http://doi.org/10.1016/S0021-9673(99)01276-5)
- Irigoyen, A., Izco, J. M., Ibáñez, F. C., & Torre, P. (2001). Influence of rennet milk-clotting activity on the proteolytic and sensory characteristics of an ovine cheese. *Food Chemistry*. [http://doi.org/10.1016/S0308-8146\(00\)00267-3](http://doi.org/10.1016/S0308-8146(00)00267-3)
- Jacob, M., Jaros, D., & Rohm, H. (2011). Recent advances in milk clotting enzymes. *International Journal of Dairy Technology*, 64(1), 14–33.
- Jacob, M., Jaros, D., & Rohm, H. (2011). Recent advances in milk clotting enzymes. *International Journal of Dairy Technology*.
<http://doi.org/10.1111/j.1471-0307.2010.00633.x>
- Jorge, C. dos A. F. (1995). *Efeito do coalho animal e vegetal nas caraterísticas físico-químicas do queijo de ovelha. Estudo preliminar das relações entre avaliação organoléticas e as caraterísticas químicas*. Universidade de Évora.
- Juan, B., Ferragut, V., Buffa, M., Guamis, B., & Trujillo, A. J. (2007). Effects of High Pressure on Proteolytic Enzymes in Cheese: Relationship with the Proteolysis of Ewe Milk Cheese. *Journal of Dairy Science*.
<http://doi.org/10.3168/jds.2006-791>
- Macedo, I. Q., Faro, C. J., & Pires, E. M. (1993). Specificity and Kinetics of the Milk-Clotting Enzyme from Cardoon (*Cynara cardunculus* L.) toward Bovine κ -Casein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*.
<http://doi.org/10.1021/jf00034a001>

- Martins, A. P. L. (1999). *A Flor o cardo (Cynara Cardunculos L.) como agente coagulante no fabrico de queijo Caracterização e influencia dos processos de conservação na atividade coagulante*. Universidade Técnica de Lisboa.
- Mayer, H. K., Rockenbauer, C., Mlcak, H., & Mayer, H. K. (1998). Original article Evaluation of proteolysis in Parmesan cheese using electrophoresis and HPLC*. *Lait*. <http://doi.org/10.1051/lait:1998441>
- McSweeney, P. L. H., & Fox, P. F. (1997a). Chemical methods for the characterization of proteolysis in cheese during ripening. *Lait*. <http://doi.org/10.1051/lait:199713>
- McSweeney, P. L. H., & Fox, P. F. (1997b). Chemical methods for the characterization of proteolysis in cheese during ripening. *Lait*, 77(1), 41–76. <http://doi.org/10.1051/lait:199713>
- Milk Composition Physicochemical Properties. (n.d.). Retrieved March 12, 2018, from http://ansci.illinois.edu/static/ansc438/Milkcompsynth/milkcomp_physicochem.html
- Neelakantan, S., Mohanty, A. K., & Kaushik, J. K. (1999). Production and use of microbial enzymes for dairy processing. *Current Science*.
- Nudda, A., Feligini, M., Battaccone, G., Macciotta, N. P. P., & Pulina, G. (2003). Full Terms & Conditions of access and use can be found at <http://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=tjas20> Download by: [b-on: Biblioteca do conhecimento online UEvora] Date: 11 December 2017, At: 06:47 Italian Journal of Animal Science. *Talian Journal of Animal Science*, 2(1), 29–39. <http://doi.org/10.4081/ijas.2003.29>
- O'Mahony, J. A., Sousa, M. J., & McSweeney, P. L. H. (2003). Proteolysis in miniature Cheddar-type cheeses made using blends of chymosin and *Cynara cardunculus* proteinases as coagulant. *International Journal of Dairy Technology*. <http://doi.org/10.1046/j.1471-0307.2003.00078.x>
- Ordiales, E., Benito, M. J., Martín, A., Fernández, M., Hernández, A., & de Guía Córdoba, M. (2013a). Proteolytic effect of *Cynara cardunculus* rennet for use in the elaboration of “Torta del Casar” cheese. *The Journal of Dairy*

Research. <http://doi.org/10.1017/S0022029913000411>

- Ordiales, E., Benito, M. J., Martín, A., Fernández, M., Hernández, A., & de Guia Córdoba, M. (2013b). Proteolytic effect of *Cynara cardunculus* rennet for use in the elaboration of “Torta del Casar” cheese. *The Journal of Dairy Research*, 80(4), 429–438. <http://doi.org/10.1017/S0022029913000411>
- Ordiales, E., Martín, A., Benito, M. J., Hernández, A., Ruiz-Moyano, S., & Córdoba, M. D. G. (2012). Technological characterisation by free zone capillary electrophoresis (FCZE) of the vegetable rennet (*Cynara cardunculus*) used in “torta del Casar” cheese-making. *Food Chemistry*. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.01.012>
- Perry, K. S. P. (2004). Queijos: Aspectos Químicos, Bioquímicos e Microbiológicos. In *Química Nova* (Vol. 27, pp. 293–300).
- Pinheiro, C. M. S. C. (2002). *Contributo para a caracterização do queijo de ovelha produzido na região de Évora: Aspectos químicos, bioquímicos do leite obtido em diferentes sistemas de produção e físico-químicos, bioquímicos, tecnológicos e organolépticos do queijo*. Universidade de Évora.
- Pino, A., Prados, F., Galán, E., McSweeney, P. L. H., & Fernández-Salguero, J. (2009a). Proteolysis during the ripening of goats’ milk cheese made with plant coagulant or calf rennet. *Food Research International*, 42(3), 324–330. <http://doi.org/10.1016/j.foodres.2008.12.009>
- Pino, A., Prados, F., Galán, E., McSweeney, P. L. H., & Fernández-Salguero, J. (2009b). Proteolysis during the ripening of goats’ milk cheese made with plant coagulant or calf rennet. *Food Research International*. <http://doi.org/10.1016/j.foodres.2008.12.009>
- Pires, E., Faro, C., Macedo, I., Esteves, C., Morgado, J., Veríssimo, P., & Gomes, D. (1994). Flor do cardo versus quimosina no fabrico de queijos artesanais. *Química Alimentaria*, 54(1), 66–68.
- Rocha, T. L., Costa, P. H. A. da, Magalhães, J. C. C., Evaristo, R. G. S., Vasconcelos, É. A. R. de, Coutinho, M. V., ... Grossi-de-Sá, M. de F. (2005). *Eletroforese Bidimensional e Análise de Proteomas*. Brasília, DF.

- Rosa, I. de F., Lidon, F. C., & Oliveira, J. F. S. (2005). Qualidade do Queijo de Évora, produzido com coagulante de origem microbiológica (*Mucor miehei*) e vegetal (*Cynara cardunculus* L.).
- Roseiro, L. B., Barbosa, M., Ames, J. M., & Wilbey, R. A. (2003a). Cheesemaking with vegetable coagulants - The use of *Cynara* L. for the production of ovine milk cheeses. *International Journal of Dairy Technology*. <http://doi.org/10.1046/j.1471-0307.2003.00080.x>
- Roseiro, L. B., Barbosa, M., Ames, J. M., & Wilbey, R. A. (2003b). Cheesemaking with vegetable coagulants - The use of *Cynara* L. for the production of ovine milk cheeses. *International Journal of Dairy Technology*, 56(2), 76–85. <http://doi.org/10.1046/j.1471-0307.2003.00080.x>
- Shah, M. A., Mir, S. A., & Paray, M. A. (2014). Plant proteases as milk-clotting enzymes in cheesemaking: A review. *Dairy Science and Technology*. <http://doi.org/10.1007/s13594-013-0144-3>
- Shalabi, S., & Fox, P. (1987a). Electrophoretic analysis of cheese: comparison of methods. *Irish Journal of Food Science and Technology*.
- Shalabi, S., & Fox, P. (1987b). Electrophoretic analysis of cheese: comparison of methods. *Irish Journal of Food Science and Technology*, 135–151.
- Silva, F., Lopes, L., & João, O. (2001). Curso de Fabrico Artesanal de Queijos. In *Manual de Fabrico Artesanal de Queijos*. Alcáçovas.
- Silva, S. V., & Malcata, F. X. (2005). Partial identification of water-soluble peptides released at early stages of proteolysis in sterilized ovine cheese-like systems: influence of type of coagulant and starter. *Journal of Dairy Science*. [http://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(05\)72870-8](http://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(05)72870-8)
- Silval, J. A. F. da, Coltro, W. K. T., Carrilho, E., & Tavares, M. F. M. (2007). Terminologia para as técnicas analíticas de eletromigração em capilares. *Química Nova*, 30(3), 740–744.
- Sousa, M. J., Ardö, Y., & McSweeney, P. L. H. (2001). Advances in the study of proteolysis during cheese ripening. *International Dairy Journal*, 11(4), 327–345. [http://doi.org/10.1016/S0958-6946\(01\)00062-0](http://doi.org/10.1016/S0958-6946(01)00062-0)

- Sousa, M., & Malcata, F. (1997). Comparison of Plant and Animal Rennets in Terms of Microbiological, Chemical, and Proteolysis Characteristics of Ovine Cheese. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*.
<http://doi.org/10.1021/jf9506601>
- Sousa, M. J. C. F. de. (1993). *Plant rennet substitutes from flowers of Cynara cardunculus*. The National University of Ireland.
- Spudeit, D. A., Dolzan, M. D., & Micke, G. A. (2012). Conceitos básicos em eletroforese capilar. *Scientia Chromatographica*.
<http://doi.org/10.4322/sc.2012.017>
- Tamer, I. M., & Mavituna, F. (1997). Protease from freely suspended and immobilised *Mirabilis jalapa*. *Process Biochemistry*.
[http://doi.org/10.1016/S0032-9592\(96\)00053-2](http://doi.org/10.1016/S0032-9592(96)00053-2)
- Tavaria, F. K., Sousa, M. J., & Malcata, F. X. (1997). Effect of storage and lyophilization on ovine and caprine casein degradation by extracts of *Cynara cardunculus* L. In *3º Encontro de Química de Alimentos - Alimentação Mediterrânica* (pp. 346–348). Faro.
- Tejada, L., Abellán, A., Cayuela, J. M., Martínez-Cacha, A., & Fernández-Salguero, J. (2008). Proteolysis in goats' milk cheese made with calf rennet and plant coagulant. *International Dairy Journal*.
<http://doi.org/10.1016/j.idairyj.2007.08.010>
- UniProt. (n.d.). UniProt. Retrieved December 1, 2017, from
<http://www.uniprot.org/uniprot/?query=cheese+casein&sort=score>
- Veloso, A. C. A. (2001). *Análise das caseínas de leite e queijos por HPLC/UV e por Ureia-PAGE*. Universidade do Porto.
- Veloso, A. C. A., Teixeira, N., & Ferreira, I. M. P. L. V. O. (2002). Separation and quantification of the major casein fractions by reverse-phase high-performance liquid chromatography and urea-polyacrylamide gel electrophoresis: Detection of milk adulterations. *Journal of Chromatography A*. [http://doi.org/10.1016/S0021-9673\(02\)00787-2](http://doi.org/10.1016/S0021-9673(02)00787-2)
- Veríssimo, P., Esteves, C., Faro, C., & Pires, E. (1995). The vegetable rennet of

Cynara cardunculus L. contains two proteinases with chymosin and pepsin-like specificities. *Biotechnology Letters*. <http://doi.org/10.1007/BF00129389>

Veríssimo, P., Faro, C., Moir, A. J., Lin, Y., Tang, J., & Pires, E. (1996).

Purification, characterization and partial amino acid sequencing of two new aspartic proteinases from fresh flowers of *Cynara cardunculus* L. *European Journal of Biochemistry / FEBS*. <http://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1996.00762.x>

ANEXOS

Anexo I : Análise descritiva dos níveis de expressão das bandas proteicas nos agentes coagulantes vegetais e animal para os vários dias de cura. (Letras minúsculas, representam as diferenças significativas entre os agentes coagulantes; Letras Maiúsculas, representam as diferenças significativas entre os dias de cura.

		<i>Cynara 1</i>		<i>Cynara 2</i>		<i>Cynara 3</i>		Animal		Sig
		Média	Desvio-Padrão	Média	Desvio-Padrão	Média	Desvio-Padrão	Média	Desvio-Padrão	Cyn
Banda A	24 Horas	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	35 Dias	-	-	-	-	-	-	2,54	0,55	-
	63 Dias	2,41 ^a	0,50	2,54 ^{a,b}	0,47	2,91 ^{a,b}	0,36	4,09 ^b	0,32	0,03
Sig	Dias	-	-	-	-	-	-	0,02	-	-
Banda B	24 Horas	7,81 ^A	1,13	7,14 ^A	0,14	7,84 ^A	0,74	7,33 ^A	0,33	-
	35 Dias	4,63 ^B	1,22	3,93 ^B	1,19	4,29 ^B	1,02	4,18 ^B	0,55	-
	63 Dias	7,05 ^{a,A,B}	0,41	6,56 ^{a,b,A,B}	0,50	6,60 ^{a,b,A,B}	0,34	5,51 ^{b,A,B}	0,28	0,02
Sig	Dias	0,02	-	0,01	-	0,01	-	0,01	-	-
Banda C	24 Horas	4,60 ^{A,B}	0,69	4,37	0,29	4,53 ^{A,B}	0,22	4,49	0,31	-
	35 Dias	3,87 ^A	0,49	4,37	0,49	4,18 ^A	0,40	-	-	-
	63 Dias	6,12 ^{a,b,B}	1,33	5,32 ^{a,b}	0,55	4,95 ^{a,B}	0,37	7,260 ^b	0,71	0,04
Sig	Dias	0,01	-	0,04	-	0,05	-	0,02	-	-
Banda D	24 Horas	-	-	-	-	-	-	5,06	0,35	-
	35 Dias	-	-	-	-	-	-	4,00	0,37	-

	63 Dias	1,98	0,10	1,97	0,39	2,36	0,54	-	-	-
Sig	Dias	-	-	-	-	-	-	0,02	-	-
Banda E	24 Horas	1,63 ^{a,b,A}	0,57	1,23 ^{a,A}	0,41	2,17 ^{a,b,A}	0,89	4,21 ^{b,A,B}	0,38	0,02
	35 Dias	3,75 ^{A,B}	0,57	3,56 ^{A,B}	0,48	3,68 ^{A,B}	0,31	3,26 ^A	0,26	-
	63 Dias	4,30 ^{a,b,B}	0,31	3,72 ^{a,B}	0,35	4,10 ^{a,b,B}	0,33	4,49 ^{b,B}	0,33	0,04
Sig	Dias	0,02	-	0,02	-	0,02	-	0,18	-	-
Banda F	24 Horas	2,02 ^{a,b,A}	0,41	1,77 ^a	0,13	2,10 ^{a,b,A}	0,34	3,39 ^b	0,51	0,03
	35 Dias	3,08 ^{A,B}	0,53	2,85	0,44	3,46 ^B	0,14	3,27	0,48	-
	63 Dias	3,18 ^B	0,14	2,95	0,10	3,21 ^{A,B}	0,43	3,51	0,28	-
Sig	Dias	0,02	-	0,03	-	0,02	-	-	-	-
Banda G	24 Horas	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	35 Dias	2,79	-	2,49	0,55	3,07	0,45	-	-	-
	63 Dias	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sig	Dias	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Banda H - β -CN	24 Horas	32,73 ^{a,b,A}	1,01	33,16 ^{a,b,A}	0,90	31,74 ^{a,A}	1,45	36,51 ^{b,A}	0,96	0,02
	35 Dias	22,54 ^{a,A,B}	1,17	21,92 ^{a,b,A,B}	3,13	23,80 ^{a,b,A,B}	1,87	30,29 ^{b,B}	2,80	0,03
	63 Dias	19,70 ^{a,B}	1,92	21,31 ^{a,b,B}	0,96	20,224 ^{aB}	0,53	31,05 ^{b,A,B}	1,14	0,02
Sig	Dias	0,01	-	0,02	-	0,01	-	0,02	-	-
Banda I - α -CN	24 Horas	40,23 ^A	3,51	42,85 ^A	0,79	37,75 ^A	2,39	41,53 ^A	0,92	-
	35 Dias	19,76 ^{a,b,A,B}	1,03	21,35 ^{a,b,A,B}	1,48	19,01 ^{a,A,B}	1,88	23,31 ^{b,B}	0,84	0,02
	63 Dias	17,80 ^{a,b,B}	0,27	19,28 ^{a,b,B}	1,21	17,38 ^{a,B}	0,40	24,15 ^{b,A,B}	0,77	0,01
Sig	Dias	0,01	-	0,01	-	0,02	-	0,02	-	-
Banda J	24 Horas	5,59 ^{a,b,A}	0,52	4,30 ^{a,A}	0,59	6,39 ^{b,A}	0,96	0,00	-	0,02
	35 Dias	30,73 ^B	3,38	30,36 ^B	1,43	31,26 ^B	0,56	-	-	-

	63 Dias	26,77 ^{A,B}	1,09	25,79 ^{A,B}	0,87	27,58 ^{A,B}	0,86	-	-	-
Sig	Dias	0,02	-	0,01	-	0,01	-	-	-	-
Banda K	24 Horas	6,20 ^A	0,72	5,79 ^A	0,64	7,60 ^A	1,49	0,00	-	
	35 Dias	11,82 ^{A,B}	0,47	10,43 ^{A,B}	0,92	9,73 ^{A,B}	1,33	-	-	-
	63 Dias	13,15 ^B	0,63	12,81 ^B	0,94	13,99 ^B	0,68	-	-	-
Sig	Dias	0,01	-	0,01	-	0,02	-	-	-	-
Banda L	24 Horas	11,79 ^A	1,14	10,09 ^A	1,08	13,98 ^A	2,26	0,00	-	0,05
	35 Dias	42,55 ^{a,B}	3,00	40,79 ^{a,b,B}	1,64	40,98 ^{a,b,B}	1,87	29,58 ^b	3,39	0,02
	63 Dias	29,45 ^{a,b,A,B}	0,46	29,02 ^{a,b,A,B}	0,54	31,04 ^{a,A,B}	0,32	24,71 ^b	1,37	0,01
Sig	Dias	0,01	-	0,01	-	0,01	-	0,04	-	-

Anexo II: Valores percentuais dos níveis de expressão das caseínas, para os diferentes agentes coagulantes e dias de cura.

	Zonas	24 Horas	35 Dias	63 Dias
<i>cynara1</i>	γ -caseínas	16,07	18,12	25,03
	β -caseína	32,72	22,54	19,70
	α s-caseína	40,23	19,76	17,80
	pré α s-caseína	11,79	42,55	29,45
<i>cynara2</i>	γ -caseínas	14,51	17,20	23,06
	β -caseína	33,16	21,92	21,31
	α s-caseína	42,85	21,34	19,28
	pré α s-caseína	10,09	40,79	29,02
<i>cynara3</i>	γ -caseínas	16,64	18,68	24,13
	β -caseína	31,73	23,80	20,22
	α s-caseína	37,75	19,01	17,38
	pré α s-caseína	13,98	40,98	31,04
animal	γ -caseínas	24,49	17,26	24,86
	β -caseína	36,51	30,29	31,05
	α s-caseína	41,53	23,31	24,14
	pré α s-caseína	0,00	29,58	24,71

Anexo III: Análise descritiva dos níveis de expressão dos *spots* que apresentam diferenças significativas nos agentes coagulantes vegetais e animal para os vários dias de cura.

		Animal	Cynara	Valor p		
		Média/Desvio Padrão	Média/Desvio Padrão	Dias de Cura	Agente coagulante	DiaCura*Ag Coagulante
Spot1	24 Horas	1,66 ± 0,45	16,24 ± 3,73	0,05	0,00	0,00
	35 Dias	4,64 ± 3,00	3,39 ± 1,58			
	63 Dias	0,61 ± 0,21	13,61 ± 4,48			
Spot2	24 Horas	1,07 ± 0,46	4,63 ± 3,10		0,04	
	35 Dias	2,00 ± 2,34	2,40 ± 1,59			
	63 Dias	1,38 ± 0,08	4,00 ± 1,77			
Spot20	24 Horas	4,69 ± 0,53	7,36 ± 2,12	0,05		0,02
	35 Dias	5,66 ± 1,76	1,30 ± 0,49			
	63 Dias	5,75 ± 1,54	4,68 ± 3,20			
Spot22	24 Horas	0,07 ± 0,00	0,13 ± 0,09	0,00		
	35 Dias	0,73 ± 0,48	0,48 ± 0,17			
	63 Dias	0,34 ± 0,08	0,25 ± 0,10			
Spot24	24 Horas	0,23 ± 0,03	0,07 ± 0	0,00		
	35 Dias	0,99 ± 0,75	0,65 ± 0,21			
	63 Dias	0,52 ± 0,50	0,40 ± 0,29			
Spot31	24 Horas	0,50 ± 0,01	0,76 ± 0,38			0,04
	35 Dias	0,92 ± 0,22	0,11 ± 0			
	63 Dias	0,50 ± 0,04	0,53 ± 0,09			
Spot34	24 Horas	22,32 ± 3,69	0,21 ± 0,04	0,00	0,00	0,00
	35 Dias	12,64 ± 6,51	9,90 ± 3,73			
	63 Dias	14,49 ± 7,18	5,39 ± 4,87			
Spot48	24 Horas	0,23 ± 0,08	0,31 ± 0,15		0,04	
	35 Dias	0,64 ± 0,57	0,19 ± 0,09			
	63 Dias	0,68 ± 0,06	0,35 ± 0,28			
Spot53	24 Horas	0,22 ± 0,02	7,51 ± 3,66		0,00	
	35 Dias	2,44 ± 0,98	3,45 ± 1,52			
	63 Dias	1,12 ± 1,14	6,41 ± 3,39			

Anexo IV: Análise descritiva dos níveis de expressão dos *spots* que apresentam diferenças significativas entre os vários agentes coagulantes para os vários dias de cura.

		Animal		Cynara 1		Cynara 2		Cynara 3				
		Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	Sig. Ag Coagulantes	Massa Molecular	Ponto isoelétrico
Spot 1	24 Horas	1,66 ^a	0,45	14,60 ^{a,b}	7,37	15,85 ^{a,b,A}	0,96	18,24 ^b	0,80	0,04	20,68	4,5
	35 Dias	4,64	3,00	2,19	0,37	3,79 ^B	0,13	4,18	2,81			
	60 Dias	0,61	0,21	14,42	2,44	13,45 ^A	0,88	12,94	9,56			
	Sig. DiaCura					0,00						
Spot 2	24 Horas	1,07 ^a	0,46	3,94 ^{a,b}	0,59	1,83 ^a	1,85	8,11 ^b	1,84	0,02	16,99	4,8
	35 Dias	2,01	2,34	1,90	1,86	2,66	2,81	2,65	0,69			
	60 Dias	1,38	0,08	2,46	0,79	5,55	0,64	4,00	2,24			
	Sig. DiaCura											
Spot 16	24 Horas	0,26	0,01	0,60	0,14	1,36	0,15			0,01	20,45	5,6
	35 Dias											
	60 Dias											
	Sig. DiaCura											
Spot 19	24 Horas	0,15	0,05					1,10	0,09			5,6
	35 Dias							.	.			
	60 Dias	-	-	-	-	0,28	-	0,48	0,14			
	Sig. DiaCura							0,03				
Spot 20	24 Horas	4,69	0,53	7,91	4,37	6,44	0,85	7,74 ^A	0,23		17,75	5,3
	35 Dias	5,66 ^a	1,76	1,33 ^b	0,23	1,19 ^b	0,40	1,37 ^{b,B}	0,97	0,03		
	60 Dias	6,90	1,87	5,34	0,19	7,99	2,99	2,80 ^B	0,39			
	Sig. DiaCura							0,00				
Spot 21	24 Horas	4,60	0,08	9,61	6,08	4,63	4,12	7,91	1,53		17,77	5,5

	35 Dias	7,98	-	1,11	-	1,37	1,06	0,58	-			
	60 Dias	6,39	1,00	3,75	1,00	3,30	0,62	3,69	0,01	0,05		
	Sig. DiaCura											
Spot 22	24 Horas	0,07	0,00	0,20	-	0,07	-	-	-	0,01	22,22	5,6
	35 Dias	0,73	0,48	0,52	0,17	0,61	0,11	0,32	0,09			
	60 Dias	0,34	0,08	0,30	0,03	0,32	0,08	0,14	0,05			
	Sig. DiaCura											
Spot 23	24 Horas	4,70	1,64	0,35	0,40	-	-	0,50	0,18	0,04	19,09	5,8
	35 Dias	3,80	-	3,54	0,85	1,86	0,63	0,72	-			
	60 Dias	2,60	0,37	-	-	-	-	3,28	-			
	Sig. DiaCura			0,04								
Spot 26	24 Horas	0,43 ^A	0,07	0,26	0,25	0,38	0,33	0,49	0,21			5,5
	35 Dias	0,23 ^B	0,04	0,53	.	0,42	0,29	0,23	0,17			
	60 Dias	0,23 ^B	0,01	0,08	0,06	0,08	0,02	0,21	0,17			
	Sig. DiaCura	0,03										
Spot 28	24 Horas	0,89	0,06	-	-	1,61	0,02	1,79	0,19	0,01	29,48	8,5
	35 Dias	-	-					-	-			
	60 Dias	0,92	0,01	0,07	-	-	-	0,56	0,02	0,00		
	Sig. DiaCura							0,01				
Spot 29	24 Horas	0,64	0,12	1,03	0,72	0,47	0,02	1,30	0,11		29,73	7,8
	35 Dias	0,87	0,16	0,45	.	.	.	0,80	.			
	60 Dias	0,70	0,05	0,27	0,04	0,36		0,38	0,02	0,01		
	Sig. DiaCura											
Spot 31	24 Horas	0,50 ^a	0,01	0,65 ^{a,b}	0,08	0,42 ^a	0,24	1,20 ^{b,A}	0,12	0,02	29,16	6,9
	35 Dias	0,92	0,22	.	.	-	-	0,11	-			
	60 Dias	0,50	0,04	0,54	0,13	0,47	0,09	0,58 ^B	0,12			
	Sig. DiaCura							0,03				

Spot 34	24 Horas	22,33	3,69	0,24		0,17		0,22		0,03	27,82	4,9
	35 Dias	12,64	6,51	9,86 ^A	0,30	13,49	3,52	6,35	2,49			
	60 Dias	8,50 ^a	0,21	1,27 ^{b,B}	1,15	1,24 ^b	0,61	3,67 ^b	1,49	0,01		
	Sig. DiaCura			0,01								
Spot 39	24 Horas	0,07	0,01	0,23 ^A	0,15	0,43	.	0,26	0,12			5,5
	35 Dias	0,47	0,30	1,13	-	0,07	.	.	.			
	60 Dias	0,21	0,09	0,17 ^B	0,02	0,42	0,14	0,13	0,16			
	Sig. DiaCura			0,03								
Spot 41	24 Horas	0,22	0,13	0,28	0,16	0,44	.	0,50	0,08			5,6
	35 Dias					0,08	.	.	.			
	60 Dias	-	-	-	-	0,21	-	0,13	0,06			
	Sig. DiaCura							0,03				
Spot 46	24 Horas	0,04 ^A	0,00	0,09	0,05	0,37	0,27	0,12	0,05		79,85	3,4
	35 Dias	0,06 ^{A,B}	-	-	-	0,11	-	-	-			
	60 Dias	0,08 ^B	0,00	0,11	-	0,14	-	0,06	0,01	0,03		
	Sig. DiaCura	0,01										
Spot 47	24 Horas	0,07		0,28	0,04	0,60		0,46 ^A	0,02	0,02	91,28	5,7
	35 Dias	0,52	0,23	-	-	0,15	-	0,09 ^B	0,07			
	60 Dias	.	.	0,26	0,00	-	-	0,13	-			
	Sig. DiaCura							0,04				
Spot 48	24 Horas	0,23	0,08	0,29	0,21	0,34	0,22	0,29	0,13		88,15	5,6
	35 Dias	0,64	0,57	0,25	0,04	0,17	0,06	0,15	0,16			
	60 Dias	0,68	0,06	0,20	0,18	0,69	0,13	0,17	0,02	0,02		
	Sig. DiaCura											
Spot 53	24 Horas	0,22	0,02	5,80	6,08	7,18	2,51	9,57	3,02		19,50	4,6
	35 Dias	2,44	0,98	3,13	1,37	4,77	1,92	2,44	0,57			
	60 Dias	0,69 ^a	0,32	10,43 ^b	2,62	8,87 ^b	1,25	5,52 ^{a,b}	1,56	0,02		

	Sig. DiaCura											
Spot 56	24 Horas	0,10 ^A	0,06	0,85	-	-	-	-	-			5,1
	35 Dias	0,55 ^{A,B}		0,19	.							
	60 Dias	0,52 ^B	0,02	0,11	0,05	0,29	-	-	-			
	Sig. DiaCura	0,02										
Spot 75	24 Horas	0,03	0,00	0,14 ^A	0,01	.	.	-	-			3,9
	35 Dias	0,08	.	0,51		0,30	.	-	-			
	60 Dias	0,15	0,09	0,12 ^B	0,01	0,39	-	-	-			
	Sig. DiaCura			0,00								
Spot 89	24 Horas	0,18 ^a	0,02	0,52 ^b	0,07	0,19 ^a	0,09	0,26 ^{a,b}	0,11	0,03	21,17	6,5
	35 Dias	0,09	.	-	-							
	60 Dias	.	.	0,13	-							
	Sig. DiaCura											